

Aus der Anatomischen Anstalt (Lehrstuhl II)  
der Ludwig-Maximilians-Universität München  
Vorstand: Prof. Dr. rer.nat. Dr. med. U. Welsch

**Ultrastrukturelle und immunhistochemische Untersuchungen an den  
C-Zellen der Schilddrüse des kleinen Igel Tenrek, *Echinops telfairi***

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von  
Patrick Vonnahme

aus

Brilon

2003

## **Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität München**

Berichterstatter: Prof.Dr.med. H. Bartels

Mitberichterstatter: Prof.Dr.med. R. Gärtner

Mitbetreuung durch  
den promovierten  
Mitarbeiter: Dr.rer.nat. T. Jeziorowski

Dekan: Prof.Dr.med. Dr.h.c. K. Peter

Tag der mündlichen  
Prüfung: 16.Oktober 2003

1	Einleitung.....	5
1.1	Die C-Zellen der Schilddrüse .....	5
1.2	Calcitonin.....	9
1.3	Echinops telfairi (kleiner Igel Tenrek).....	12
1.4	Fragestellung.....	13
2	Material und Methoden.....	14
2.1	Organentnahme und Gewebepräparation.....	14
2.2	Immunzytochemische Untersuchungen.....	16
	Tabelle 1 .....	17
	Immunhistochemische Protokolle.....	17
2.3	Lektinhistochemische Untersuchungen .....	20
	Tabelle 2 .....	21
2.4	Mikroskopische Technik.....	23
	Lichtmikroskopie .....	23
	Elektronenmikroskopie .....	23
3	Befunde.....	24
3.1	Allgemeine Morphologie.....	24
3.2	Immunhistochemie.....	27
	Formaldehydfixierung, Unicryleinbettung .....	27
	Lichtmikroskopie .....	27
	Elektronenmikroskopie .....	29

	Calcitonin.....	32
	Lektine .....	35
4	Diskussion.....	36
5	Zusammenfassung .....	46
6	Literaturverzeichnis .....	47

# 1 Einleitung

## 1.1 Die C-Zellen der Schilddrüse

Bereits im Jahr 1876 hat E. Baber bei der mikroskopischen Untersuchung der Schilddrüse eines Hundes neben den Thyreozyten eine zweite, morphologisch distinkte Zellart beschrieben. Seitdem wurden diese Zellen mit unterschiedlichen Namen belegt, z.B. protoplasmareiche Zellen (Hürtle, 1894), ovoide Zellen (Bensley, 1914), interfollikuläre Zellen (Takagi, 1922), neurohormonale Zellen (Sunder-Plassmann, 1939), Makrothyreozyten (Kroon, 1958). Durchgesetzt haben sich die Bezeichnungen parafollikuläre Zellen (Nonidez, 1931) und C-Zellen (Pearse, 1966a). Im folgenden Text wird für diese Zellen der Begriff C-Zelle verwendet.

Hinsichtlich der Funktion der C-Zellen bestand lange Zeit Unklarheit. So wurde angenommen, dass diese Zellen bestimmte Stadien im Zyklus der Thyreozyten (Saito, 1956), Nervenzellen (Sunder-Plassmann, 1939), oder ektope Zellen der Nebenschilddrüse darstellen (Getzowa, 1907). Einige Autoren haben die Existenz der C-Zellen als separaten Zelltyp der Schilddrüse sogar abgelehnt, indem sie behaupteten, es handle sich bei diesen Zellen um Artefakte, welche durch die zu ihrem Nachweis angewandten Methoden entstanden seien (Ehrenbrand, 1954; Ludwig, 1953,1954). Den ersten Hinweis auf einen funktionellen Unterschied zwischen C-Zellen und Thyreozyten entdeckte Nonidez (1931,1932,1933) bei histochemischen Studien der Schilddrüse von Hunden, indem er Granula in den C- Zellen mittels der Versilberungsmethode nach Cajal nachwies. Ein entscheidender Schritt zur funktionellen Unterscheidung von C-Zellen und Thyreozyten war die Entdeckung, dass C-Zellen unabhängig vom TSH sind (Isler et al. 1960) .

Die Entdeckung des Calcitonins führte zu Überlegungen, ob die C-Zellen die zelluläre Produktionsstätte dieses Peptidhormones sein könnten (Copp et al., 1962). So demonstrierten Foster und Mitarbeiter 1964 die Degranulation von C-Zellen, nachdem sie die Schilddrüse eines Kaninchens mit einer hypercalcaemischen Lösung perfundiert hatten. Bald darauf wurde die spezifische Lokalisation von Calcitonin in den C-Zellen von Hunden und Schweinen mit immunhistochemischen Methoden nachgewiesen (Bussolati und Pearse, 1967; Kracht et al., 1968).

#### *Morphologie und Lokalisation der C-Zellen*

Die C-Zellen unterscheiden sich von Thyreozyten aufgrund ihrer Form, Größe und Lage. Sie sind häufig oval und zwei- bis dreimal größer als die Thyreozyten. C-Zellen liegen zwischen den Thyreozyten („intrafollikulär“) oder zwischen der Basalmembran und Thyreozyten („parafolliculär). In lichtmikroskopischen Studien wurde auch eine „interstitielle (interfollikuläre) Lage“, also außerhalb der follikulären Basalmembran, vermutet (Carvalheira und Pearse, 1967; Gabe und Martoja, 1969, Salzer, 1971). Elektronenmikroskopische Untersuchungen haben jedoch gezeigt, dass die C-Zellen von einer Basalmembran umgeben sind (Lietz, 1971). Bei einigen Spezies wurden „helle“ von „dunklen“ C-Zellen differenziert (Jordan et al., 1973; Kiyama et al., 1968). Ob diese Subtypen auf einem funktionellen Unterschied der C-Zellen basieren, ist nicht bekannt (Nunez und Gershon, 1978).

Die C-Zellen sind bei den meisten Säugetieren in geringer Anzahl vorhanden, wobei bei Mäusen 1% der Zellen im Schilddrüsenepithel (Marks, 1969; Marks und Walker, 1969; Walker, 1966), bei Schweinen ebenfalls 1% (Young et al., 1968), bei Kaninchen 2% (Lupulescu, 1972) und 13% bei Meerschweinchen (Sawicki, 1975) als solche identi-

fiziert wurden. Für Ratten liegen die Angaben zwischen 1% und 6% (Stux et al, 1961; Rohr und Hasler, 1968; Peng et al., 1975). Obwohl die Angaben über die Häufigkeit der C-Zellen z.T. deutlich divergieren, stimmen die Aussagen darin überein, dass die C-Zellen im Schilddrüsenepithel der Säugetiere in der Minderheit sind (Nunez und Gershon,1978). Die unterschiedliche Daten können dabei tatsächlich speziesbedingt sein oder auch auf der unterschiedlichen Spezifität der angewandten Methoden beruhen (Nunez und Gershon,1978).

### *Ursprung der C-Zellen*

Die Schilddrüse der Säugetiere geht aus zwei unterschiedlichen Anlagen hervor (Wollmann und Neve, 1971). Sie entsteht embryonal durch eine vom Boden der primitiven Mundhöhle ausgehende und in der Mittellinie gelegene Ausstülpung des Entoderms, welche nach kaudal migriert, um den Isthmus und die beiden Schilddrüsenlappen zu bilden. Aus dieser Anlage gehen die Thyreozyten und damit die Follikel hervor (Nunez und Gershon, 1978). Außerdem gibt es laterale Anlagen der Schilddrüse, die sich bei den meisten Säugetieren von den ultimobranchialen Anteilen der dritten Schlundtasche herleiten (bei Ratten aus der vierten Schlundtasche). Die lateralen Anlagen entwickeln sich ungefähr zum gleichen Zeitpunkt, zu dem die mediale Anlage entsteht. Während der weiteren Entwicklung wird der Ultimobranchial-Körper in beide Lappen der wachsenden Schilddrüse inkorporiert (Rogers, 1929; Sugiyama, 1942; Zuckermandl, 1903). Erste Hinweise auf den ultimobranchialen Ursprung der C-Zellen fand Godwin 1937: Er zeigte an Hunden, dass die C-Zellen hauptsächlich in den Bereichen vorkommen, die von den ultimobranchialen Anlagen abstammen. Nachfolgende Untersuchungen an anderen Spezies, wie zum Beispiel der Maus (Sato et al., 1966), der

Ratte (Rother, 1970; Van Dyke, 1945), dem Schaf (Jordan et al. 1973; Van Dyke, 1945), dem Hamster (Takagi et al., 1974) und dem Menschen (Lietz et al., 1971; Sugiyama et al., 1969) haben die ultimobranchiale Herkunft der C-Zellen bestätigt. So konnte die Migration der C-Zellen vom Ultimobranchialkörper in die Lappen der sich entwickelnden Schilddrüse in einigen Studien demonstriert werden (Pearse und Carvalheira 1967; Carvalheira und Pearse 1968; Fontaine 1974; Kirkeby et al., 1973).

Die C-Zellen der Schilddrüse stammen wie die Nebennierenmarkzellen, die Zellen des sympathischen Grenzstranges, die Melanoblasten, die Karotiskörper-Typ-1-Zellen und die endokrinen Zellen des Urogenitaltraktes direkt von der Neuralleiste ab. Sie besitzen die Fähigkeit, Vorstufen biogener Amine aufzunehmen und zu decarboxylieren und gehören in die Familie der APUD-Zellen (amin precursor uptake and decarboxylation) (Pearse, 1966 a;b). APUD-Zellen zeichnen sich weiterhin durch die Synthese und Freisetzung von Peptidhormonen aus. Sie werden heute zum disseminierten (diffusen) neuroendokrinen System (DNES) gerechnet (Pearse 1977; Grube und Forssmann, 1994). Als APUD-Zellen sind C-Zellen in der Lage, 5-Hydroxytryptophan aufzunehmen und zu Serotonin zu decarboxylieren.

Fujita (1977) hat als Alternative zum Apud-System von Pearse (1966a,b) ein Paraneuronkonzept formuliert. Paraneurone sind wie Neurone dadurch charakterisiert, dass sie membrangebundene Vesikel und Granula besitzen, welche bioaktive (und inaktive) Peptide, Amine und auch Chromogranine enthalten (Fujita, 1989). Diese Zellen sind keine neuronalen Zellen, ähneln diesen aber aufgrund ihrer Feinstruktur, ihres Metabolismus (Produktion von neurosekretorischen und neurotransmitter-artigen Substanzen)

und ihres neuroektodermalen Ursprungs. Aufgrund der oben beschriebenen Eigenschaften werden die C-Zellen zu den paraneuronalen Zellen gezählt (Fujita 1989).

Neben Calcitonin wurde in C-Zellen noch einige regulatorische Peptide gefunden. Manche von ihnen, wie zum Beispiel Somatostatin, Katalcalcin, TRH (thyreotropin releasing peptide) und GRP (gastrin releasing peptide) kommen in der Schilddrüse ausschließlich in den C-Zellen vor, andere, wie CGRP, Neuromedin U und Cholecystokinin wurden sowohl in C-Zellen als auch in intrathyroidalen Nervenfasern, jedoch nicht in Thyreozyten nachgewiesen (Sawicki, 1995).

## 1.2 Calcitonin

Die C-Zellen sind der Hauptort der Calcitoninsynthese im Körper. Das natürlich vorkommende Calcitonin besteht aus einer Peptidkette von zweiunddreißig Aminosäuren, wobei eine beachtliche spezies-bedingte Variabilität in der Aminosäuresequenz (Primärstruktur) des Calcitoninmoleküls besteht (Holick et al., 1994).

Es sind zwei Calcitonin-Gene,  $\alpha$  und  $\beta$ , vorhanden, die beim Menschen auf dem Chromosom 11 in der Nähe der Gene des  $\beta$ -Globulins und des Parathormones lokalisiert sind. Die beiden Calcitonin-Gene werden auch als Calcitonin/GRP-1 und Calcitonin/GRP- 2 bezeichnet (Holick et al., 1994). Durch alternatives Splicing entstehen zwei verschiedene mRNS-Moleküle vom  $\alpha$ -Gen. Eine dieser m-RNS wird in das Calcitonin-Vorläufermolekül übersetzt, welches um das Vierfache länger ist als Calcitonin selbst, die andere m-RNS in das Calcitonin-Gen verwandte Peptid (CGRP) (Holick et al., 1994). CGRP wird überall dort synthetisiert, wo das Calcitonin- $\alpha$ -Gen transskribiert

wird. Das  $\beta$ - oder CGRP-2-Gen wird nur im Zentralnervensystem (ZNS) exprimiert. Dieses Gen kodiert nur die mRNA für CGRP. Es ist für die Bildung von Calcitonin stumm.

Calcitonin ist ein hypocalcaemisch wirkendes Peptidhormon, welches der physiologische Antagonist des Parathormones (PTH) ist: Die hypocalcaemische Wirkung erfolgt einerseits durch Hemmung der Osteoklasten, indem die Resorption von mineralischer Knochensubstanz verhindert wird. Andererseits führt Calcitonin durch die Stimulation der renalen Calciumausscheidung zu einer Verminderung der Calciumkonzentration im Serum (Holick et al., 1994). Vermittelt werden diese Effekte durch Rezeptoren, welche sich in der Membran von Osteoklasten und Nierentubuluszellen befinden. Obwohl Fragmente des Calcitoninmoleküls in In-vitro-Systemen gleiche Effekte wie das gesamte Molekül zeigen, scheint die gesamte Kette der zweiunddreißig Aminosäuren für die biologische Aktivität unter In-vivo-Bedingungen benötigt zu werden (Potts, 1992).

Zusätzliche Effekte übt das Calcitonin vermutlich durch Bindung an Rezeptoren im Gastrointestinaltrakt, Immunsystem und Gehirn aus. So besitzt es zum Beispiel durch die direkte Wirkung auf hypothalamische Neurone und mit diesen in Beziehung stehenden zentralnervösen Strukturen auch analgetische Eigenschaften. Die nicht-hypocalcaemischen Effekte des Calcitonins erklären sich möglicherweise durch die Wechselwirkung des Hormons mit Rezeptoren anderer Peptidhormone, die mit diesem in enger Beziehung stehen, wie CGRP und Amylin (amyloidogenes Inselpeptid). Die beiden letztgenannten Peptide binden an spezifische Rezeptoren von hoher Affinität, können aber auch an die Calcitoninrezeptoren binden und diese triggern (Holick et al., 1994).

Die Regulation der Calcitoninsekretion hängt direkt vom Serumcalciumspiegel ab. Ein Anstieg des Serumcalciumspiegels führt zu einer vermehrten und ein Absinken des Calciumspiegels zu einer verminderten Sekretion. Aufgrund seiner kurzen Halbwertszeit von 2-15 min. verschwindet das Calcitonin schnell wieder aus dem Kreislauf (Holick et al., 1994).

Beim Menschen sind trotz Schwankungen der Hormonbildung keine Veränderungen des Calcium- und Phosphatstoffwechsels zu beobachten. Einem Calcitoninmangel sind keine definierten Effekte zuzuschreiben, ein Überschuß bleibt ebenfalls ohne spezielle Symptome, was an Patienten mit medullären Schilddrüsenkarzinomen oder anderen Calcitonin-sezernierenden Tumoren ersichtlich ist. Diese Patienten, bei denen der Knochenumbau chronisch unterdrückt ist, sind, obwohl sie keine offenkundigen Abnormitäten im Calciumstoffwechsel haben, gegen Wirkungen von exogenem zugeführtem Calcitonin am Skelett refraktär (Holick et al., 1994).

Bei gesunden Menschen ist die Calcitoninkonzentration im peripheren Blut niedriger als bei vielen anderen Spezies. Geschlechtsspezifische Unterschiede ergeben sich insofern, als bei Frauen die basalen und nach Stimulation erzielten Calcitonin-Spiegel niedriger sind als bei Männern. Mit fortschreitendem Alter fällt der Calcitonin-Spiegel ebenfalls ab (Holick et al., 1994). Therapeutischen Einsatz findet das Calcitonin zur Unterdrückung der Resorption von Knochensubstanz, wie z.B. bei der Behandlung von Osteoporose, Morbus Paget und osteoklastischen Metastasen (Holick et al., 1994).

### 1.3 *Echinops telfairi* (kleiner Igel Tenrek)

Die ursprünglich nur auf Madagaskar vorkommenden Tenrecidae sind eine sehr alte und primitive Merkmale aufweisende Säugetiergruppe. Sie zählen zu den ältesten Insektivoren (Insektenfresser), die Beziehungen zu den Primaten erkennen lassen.

Die Insektivoren bilden die erste Ordnung der „höheren“ Säugetiere (Eutheria, Placentalia). Sie werden in mehrere Überfamilien aufgeteilt, deren primitivste die der Tenrecoidea ist. Die Tenrecidae, zu denen auch *Echinops telfairi* gehört, bilden eine der drei Unterfamilien der Tenrecoidea. Wie der deutsche Name Borstenigel andeutet, haben die Tenrecidae Ähnlichkeiten mit den nicht unmittelbar mit ihnen verwandten echten Igeln oder Stacheligeln (Erinaceinae) (Storch und Welsch, 1997)



**Abb. 1** *Echinops telfairi*. Aus: <http://www.tenrec.org>

*Echinops telfairi* (Abb.1) lebt hauptsächlich an der Westküste und im Südwesten von Madagaskar in Dornwaldgebieten und Halbwüsten (Grandidier und Petit, 1932; Herter, 1962) Man findet die Tiere dort in ihren Schlupfwinkeln unter Felsblöcken, zwischen Hartlaub- und Dornenbüschen, im Dornwald unter Baumwurzeln und in Baumlöchern

nahe dem Erdboden. Sie sind nachtaktiv und ernähren sich hauptsächlich von Insekten und Würmern (Gould und Eisenberg, 1966; Herter, 1962).

## 1.4 Fragestellung

Aufgrund seiner speziellen phylogenetischen Stellung ist *Echinops telfairi* von besonderem Interesse für vergleichende Untersuchungen. Studien zu den endokrinen Organen dieser Gruppe liegen bisher nicht vor ([www.tenrec.org/biblio.htm](http://www.tenrec.org/biblio.htm)). In der vorliegenden Arbeit wurden daher im Rahmen einer größer angelegten systematischen Untersuchung der endokrinen Organe von *Echinops telfairi* die C-Zellen in der Schilddrüse dieser Art licht- und elektronenmikroskopisch sowie mit immun- und lektinhistochemischen Methoden untersucht.

In den C-Zellen des Menschen und einiger als Versuchstiere gebräuchlicher Nager kommen neben Calcitonin u.a. auch CGRP, Somastotatin und Serotonin vor (s.o.). Darüber hinaus enthalten die Granula (neuro-) endokriner Zellen Proteine vom Typ der Chromogranine (Grube und Yoshie, 1989). Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war festzustellen, welche dieser die Calcitonin-Produktion und Schilddrüsenhormon-Sekretion stimulierenden bzw. hemmenden Substanzen in den C-Zellen der Schilddrüse von *Echinops telfairi* gebildet werden, inwieweit diese Substanzen in allen C-Zellen vorkommen oder nur in einer Subpopulation. Als C-Zellen wurden die Zellen definiert, die Calcitonin-Immunreaktivität zeigten.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Organentnahme und Gewebepräparation

Schilddrüsen von 17 adulten Tieren aus der Zucht von Prof. Künzle, Anatomische Anstalt der Ludwig Maximilians Universität München (Künzle, 1998a), wurden für die vorliegende Arbeit untersucht. Es handelte sich um 12 männliche und 5 weibliche Tiere mit einem Gewicht zwischen 50-160 g, die für neuroanatomische Untersuchungen perfundiert wurden.

Nach Inhalationsnarkose mit Tribromoethanol (1,0 ml/100gKG) (Künzle, 1998 b,c), wurde der Thorax eröffnet und eine Perfusionsfixierung über den linken Ventrikel vorbereitet. Im Anschluß an eine Vorspülung mit Heparin (0,15E/100ml) in physiologischer Kochsalzlösung (0,9%) erfolgte eine Ganzkörperperfusion für 30-45 Minuten mit einer der folgenden Fixierungslösungen:

A) 4% Paraformaldehyd (pFA) in PBS 0,05M, pH 7,4

B) 4% pFA in Natriumacetatpuffer (pH 6,5) für 10 min., anschließend 4% pFA in Natriumboratpuffer (pH 9,5) für 30 min.= „2 step Fixierung“

C) 2,5% Glutaraldehyd (GA) und 1% Paraformaldehyd in PBS 0,05M, (pH 7,4) + 15% Saccharose

D) 2,5% GA und 2% pFA in PBS 0,05M, (pH 7,4)

E) 5% GA in Cacodylatpuffer 0,05M +10 g/l Natriummetabisulfat (pH 7,4)

Nach Abschluß der Perfusion wurden die gerade Halsmuskulatur und die Trachea durchtrennt und die Halsorgane im Block entnommen. Hierauf wurden die beiden Schilddrüsenlappen freipräpariert, vom Schildknorpel abgetrennt, halbiert und über Nacht bei 4°C in der jeweiligen Fixierungslösung aufbewahrt.

### **Einbettung in Paraffin für Lichtmikroskopie und Immunhistochemie**

Die mittels der Lösungen A und B fixierten Schilddrüsen wurden in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und in Paraffin eingebettet. Mit Hilfe eines Schlittenbahnmikrotoms (LEICA SM 2000R) wurden Paraffin-Schnittserien mit einer Dicke von 5µm angefertigt.

### **Einbettung in Epon für die Elektronenmikroskopie**

Die in Lösungen C-E fixierten Gewebeproben wurden unter einem Stereomikroskop in Blöcke mit einer Kantenlänge von 1-2mm zerkleinert, gründlich in 0,1M NaCacodylat-HCl-Puffer gewaschen, in einer 1% OsO<sub>4</sub> Lösung in NaCacodylatpuffer für 1h nachfixiert, in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und in Kunstharz (Epon® 812) eingebettet. Mit Hilfe eines Ultramikrotoms (Reichert-Jung, Ultracut) wurden zunächst 1µm dicke Schnitte angefertigt und mit Toluidinblau gefärbt. Anhand dieser Schnitte wurden für Ultradünnschnitte geeignete Gewebeareale ausgesucht. Ultradünnschnitte mit einer Dicke von ca. 60 nm wurden auf Kupfernetze oder Pioloform befilmte Einlochblenden aufgefangen und nach Standardverfahren mit gesättigten, wässrigen Lösungen von Uranylacetat und Bleicitrat kontrastiert (Reynolds, 1963).

## **Einbettung in Unicryl für Licht-und Immunelektronenmikroskopie**

Nach vierzigminütiger Perfusionsfixierung (Fixierungslösung A), Lagerung über Nacht bei 4 °C und Entwässerung in aufsteigender Alkoholreihe, wurden die Gewebeproben ohne Osmierung in das wasserlösliche Kunstharz Unicryl eingebettet. Dies geschah als Flacheinbettung mit anschließender UV-Polymerisation bei 4 °C. Ultradünnschnitte mit einer Dicke von ca. 60 nm wurden für die Immunelektronenmikroskopie auf Nickelnetze aufgefangen.

## **2.2 Immunzytochemische Untersuchungen**

Verschiedene immunzytochemische Methoden und Antiseren kamen zum Einsatz, um den Hormon-/Peptidgehalt der C-Zellen zu bestimmen. Für die Untersuchungen an Paraffinschnitten und Kunstharzschnitten wurde der indirekte immunhistochemische Nachweis mittels Avidin-Biotin-Peroxidasekomplex- (ABC-) Technik eingesetzt (Hsu et al., 1981). Die Immun-Gold-Technik wurde im postembedding-Verfahren an Semidünnschnitten und Ultradünnschnitten angewendet (De Mey, 1983; Bendayan, 1982). Als primäre Antikörper dienten jeweils polyklonale Antiseren gegen verschiedene Peptidhormone und Neuropeptide (s.Tabelle 1,2). Alle sekundären Antikörper stammten von der Ziege.

Zur Übersicht wurden einige Paraffinschnitte nach Standardmethoden Hämalaun-Eosin bzw. Semidünnschnitte mit Toluidinblau gefärbt. Einige Schnittserien, die lichtmikroskopisch untersucht wurden, wurden mit Hämalaun (Paraffinschnitte) bzw. Toluidinblau (semidünne Kunstharzschnitte) gegengefärbt.

**Tabelle 1**

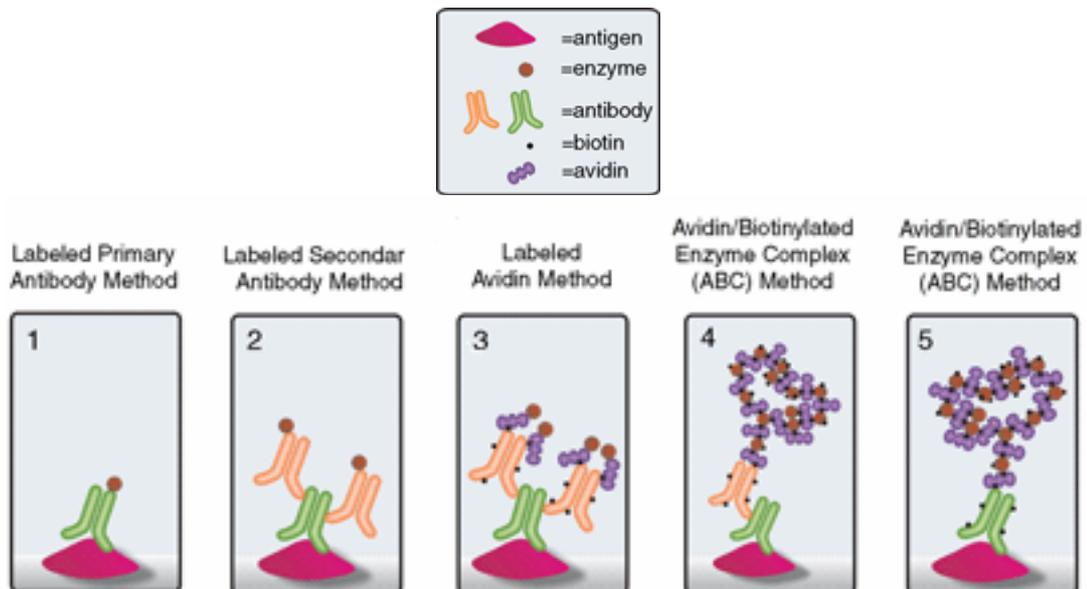
<b>Antiserum</b>	<b>Quelle</b>	<b>Arbeits- Verdünnung</b>	<b>Referenzen</b>
Calcitonin	BioGenex	1:1000	Kameda et al, 1980
Serotonin	BioGenex	1:1000	Grube und Forssmann, 1979
CGRP	BioTrend	1:15000	Sikri et al., 1985
Somatostatin	BioGenex	1:10-1:1000	Dubois, 1975
Chromogranin A (CgA)	BioTrend	1:10-1:1000	Konecki et al. 1987
Chromogranin A (CgA)	Prof. Grube	1:2000	Jezirowski et al. 1997
Secretogranin II (SgII-N und SgII-C)	Prof. Grube	1:5000	Jezirowski et al. 1997
Neuronen-spezifische Enolase (NSE)	BioGenex	1:10	Lloyd, 1984
S-100	ZymedLab		Loeffel et al., 1985
NFP	BioTrend	1:500	Iwanaga et al. 1989

### **Immunhistochemische Protokolle**

#### *Paraffineinbettung, ABC-Methode*

Die Demaskierung der Antigene erfolgte durch Erhitzen in einer mit Zitratpuffer (0,01 M, pH 6,0) gefüllten Küvette in der Mikrowelle (Reynolds et al., 1994; Brown und Chirala, 1995). Nach Abkühlen bei Raumtemperatur (ca. 15 Minuten) wurden die Schnitte zur Blockierung der endogenen Peroxidase 10 Minuten mit 1% Wasserstoff-

peroxid ( $H_2O_2$ ) behandelt. Darauf hin wurden die unspezifischen Bindungsstellen mit Non-Immun-Serum von der Spezies, von der der zweite Antikörper stammt, in diesem Falle der Ziege, blockiert (30 Minuten, 20 °C) und mit den verschiedenen Antiseren nach der Avidin-Biotin-Peroxidase-(ABC-)Methode inkubiert (Hsu et al., 1981). Dabei wurden die Schnitte nach der Inkubation mit den unterschiedlichen primären Antiseren (24 h, 4 °C) zunächst mit biotinyliertem anti-Kaninchen-Gamma-Immunglobulin der Ziege (VECTOR; Burlingame CA, USA) markiert. Die Inkubationszeit betrug 45 Minuten bei 20 °C. Hierauf erfolgte die Behandlung mit einem Streptavidin-Peroxidase-Komplex (VECTOR) ebenfalls für 45 Minuten bei 20° C (Abb.2).



**Abb. 2:** Aus: <http://www.vectorlabs.com>

Die eingesetzten Antiseren und Reagenzien wurden in Phosphat- gepufferter Kochsalzlösung verdünnt (0,01 M Phosphatpuffer (PB), die bovines Serumalbumin (BSA, SERVA, Heidelberg) in 0,15 M NaCl-Lösung, pH 7,3, enthält. Die Verdünnung der ABC-Reagenzien erfolgte den Herstellerangaben entsprechend. Der Ansatz für den Peroxidasekomplex-Nachweis bestand aus 0,7 mM DAB (3'3'-Diaminobenzidin-Tetra-

hydrochlorid, SIGMA No. D 5637) und 0,002% Wasserstoffperoxid in 0,05 M Tris-HCl-Puffer, pH 7,6. Die Inkubationszeit betrug 10 Minuten bei einer Temperatur von 20 °C.

Zwischen den oben genannten Arbeitsschritten wurden die Schnitte jeweils gründlich mit Phosphat-gepuffertes Kochsalzlösung gespült. Diese bestand aus 0,01 M Phosphatpuffer mit bovinem Serumalbumin (PBS) in 0,5 M NaCl-Lösung, pH 7,6, und 0,1% Tween 20 (SIGMA).

#### *Spezifitätskontrollen*

Zum Ausschluss von methodisch bedingten unspezifischen Reaktionen wurden Spezifitätskontrollen durchgeführt (Grube und Kusomoto 1986; Sternberger 1986; Grube und Yoshie 1989). In Negativkontrollen wurden entweder die Primär-Antiseren durch Puffer oder Kaninchen-Null-Serum ersetzt oder der zweite Antikörper oder der ABC-Komplex durch Puffer ersetzt bzw. ausgelassen. Zusätzlich wurden besonders hohe Verdünnungen des Primär-Antikörpers in Verdünnungsreihen eingesetzt.

#### *Positivkontrollen*

Positivkontrollen wurden an verschiedenen Organen der Ratte durchgeführt, in denen die Immunreaktion für die verschiedenen Antiseren aus früheren Untersuchungen im Labor bekannt war. Schnitte folgender Organe wurden nach dem gleichen Protokoll behandelt, wie die Schnitte der Schilddrüse von *Echinops telfairi*: Schilddrüse für die Calcitonin-, Duodenum für die Serotonin-, Rückenmark für die CGRP-, Pankreas für

die Somatostatin-, Darm für die CgA- und Hypophyse für die SgII- sowie die NSE-Immunreaktion.

### **2.3 Lektin histochemische Untersuchungen**

Neben den immunhistochemischen Untersuchungen wurden auch biotinylierte Lektine zur Charakterisierung der C-Zellen eingesetzt (s. Tab. 2)

Lektine sind Proteine, welche spezifisch mit terminalen Zuckermolekülen von polymeren Kohlenhydraten reagieren (Boyd, 1954). Als Reaktionsergebnis kommt es zu einer Präzipitation bzw. Agglutination der Lektine mit löslichen oder zellgebundenen kohlenhydrathaltigen Substraten. Ursprünglich wurden die Lektine in Pflanzen nachgewiesen.

An entparaffinierten Schnitten erfolgte zunächst die Blockierung der endogenen Peroxidase für 10 Minuten in 1% Wasserstoffperoxid. Die Schnitte wurden dann mit 1% BSA in 0,01M PBS (0,15 M NaCl) in einer feuchten Kammer und bei Raumtemperatur für 15 Minuten behandelt. Nach dem Abfließen des BSA-Tropfens folgte die Inkubation bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer für 60 Minuten mit den verschiedenen Lektinen (siehe Tabelle 2). Diese wurden in 0,01 M PBS (0,15 M NaCl) verdünnt. Danach wurden die biotinylierten Lektine mit dem ABC-Peroxidase-Komplex inkubiert und der Peroxidase-Nachweis analog zum Antiseren-Protokoll mit der gleichen DAB-Wasserstoffperoxid-Lösung, unter den gleichen Bedingungen durchgeführt. Die Schnitte wurden auch zwischen den Inkubationsschritten mit Phosphat-gepufferter NaCl-Lösung (0,01 M PBS, 0,5 M NaCl) gespült. Spezifitätskontrollen wurden durchgeführt,

indem die jeweiligen Lektine mit gesättigten Lösungen der korrespondierenden Zucker inkubiert wurden.

**Tabelle 2**

<b>Lektin</b>	<b>Quelle</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Kohlenhydrat-Bindungscharakteristik</b>
Wisteria Floribunda Lektin (WFA)	Vector	10µg/ml	GalNAc ( $\alpha$ -1,6) Gal > GalNAc ( $\beta$ -1,6) Gal >...
Canavalia ensiformis (Concanavalin A = Con A)	Vector	5-20µg/ml	Alpha-gebundene Mannose
Triticum vulgare (Wheat Germ Agglutinin =WGA)	Vector	5-20µg/ml	GlcNAc, gebunden an Di- /Trimere, Glycolipide etc. terminale GlcNAc [ $\beta$ 1-4]
Maackia Amurensis Lektin II (MAL II)	Vector	5-20µg/ml	N-Acetylneuraminsäure (alpha-2,3-gebunden)
Arachis hypogea (Peanut Agglutinin = PNA)	Vector	5-20µg/ml	terminal Gal-( $\beta$ -1,3)- GalNAc
Glycine max (Soybean Agglutinin = SBA)	Vector	5-20µg/ml	terminal $\alpha$ -GalNAc > $\beta$ -GalNAc > $\alpha/\beta$ -Gal
Ulex Europeus Agglutinin I (UEA-I)	Vector	5-20µg/ml	terminal $\alpha$ -L-Fucose
Helix pomatia (HPA)	Vector	5-20µg/ml	$\alpha$ -N-Acetyl-Galaktosamin

Abkürzungen: GalNAc = N-Acetylgalaktosamin, Gal = Galaktose, GlcNAc = N-Acetylglucosamin,

## **Unicryl, Immungold-Methode**

### *Lichtmikroskopie, Semidünnschnitte*

Zur Antigen-Reaktivierung wurden die Unicryl-Semidünnschnitte in der Mikrowelle erwärmt bzw. mit Trypsin vorbehandelt (Suurmeijer und Boon, 1993)

Die Inkubation mit den Primär-Antikörper-Lösungen erfolgte über Nacht bei 4°C. Als zweiter Antikörper wurde Gold markiertes polyklonales IgG (Ziege anti-Kaninchen) verwendet (1h, 20°C). Zum Spülen zwischen den Inkubationsschritten wurde eine 0,02 M Tris-HCl-gepufferte, 0,5 M Natriumchloridlösung, pH 8,2, mit einem Zusatz von 0,1 % BSA benutzt. Zur Verdünnung der Antikörper wurde der gleiche Puffer wie zum Spülen, jedoch mit einem Zusatz von 0,15 M Natriumchlorid verwendet.

Die Immunreaktion wurde zusätzlich durch Silber verstärkt, indem jeweils drei Tropfen eines Initiators und eines Enhancers als „Silver enhancing kit“ (British Biocell international Ltd.,) gemischt und unter mikroskopischer Kontrolle auf die Schnitte aufgetragen wurden. Die Reaktion wurde, entsprechend der Herstellerangaben, bei Erreichen des Ergebnisses (Braunfärbung des Schnitts) durch fließendes Leitungswasser gestoppt.

### *Elektronenmikroskopie*

Nach Spülen der Unicryl-Ultradünnschnitte für 15 Minuten mit Aqua bidest. wurden diese zunächst mit 5% Ziegen-Null-Serum (20 Minuten bei 20°C), darauf mit den Primär-Antikörper-Lösungen gegen die jeweiligen Hormone inkubiert (Verdünnungen von 1:10 bis 1:500, 24 h, 4 °C). Zur Verdünnung der Antikörper, sowie zum Spülen, wurden die gleichen Puffer wie bei den Semidünnschnitten benutzt.

Die Markierung erfolgte nach der „Immun-Gold“-Methode von De Mey (1983). Hierbei diente Gold-markiertes polyklonales Ziege anti-Kaninchen Gamma-Immunglobulin (JANSSEN, Beerse, Belgien) als zweiter Antikörper. Die Größe der Goldpartikel betrug 15 nm, die Inkubationszeit 60 Minuten bei einer Temperatur von 20 °C. Im Anschluß an die Inkubation wurden die Netze nach Standardmethoden mit gesättigten Uranylacetat- und Bleicitrat-Lösungen kontrastiert.

### *Spezifitätskontrollen*

Zur Vermeidung unspezifischer Reaktionen wurden die Ultra- bzw. Semidünnschnitte vor der Inkubation mit den Primär-Antiseren mit Nullserum behandelt. Ferner diente das Auslassen des Primär-Antikörpers als Kontrolle. Auch wurden zum Spülen zwischen den Inkubationsschritten höhermolekulare Puffer benutzt.

## **2.4 Mikroskopische Technik**

### **Lichtmikroskopie**

Die Beobachtung und Dokumentation erfolgte an einem Olympus Bx 50 Photomikroskop, das mit einer Digitalkamera Olympus DP 50 und mit UPlanAPO 10-, 20- und 40-Objektiven (Olympus) ausgestattet ist. Die Bilder wurden mit Olympus DP Soft auf einem PC gespeichert.

### **Elektronenmikroskopie**

Die Ultradünnschnitte wurden an einem Transmissions-Elektronenmikroskop Philips CM-10 untersucht. Hierbei wurden Primärvergrößerungen zwischen 1200x und 28000x gewählt.

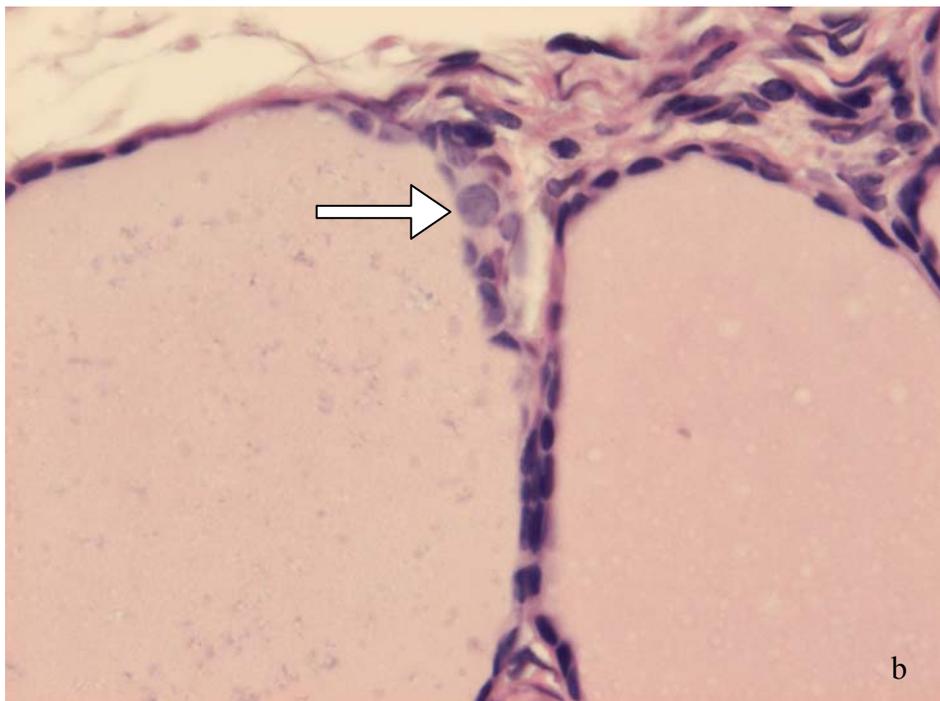
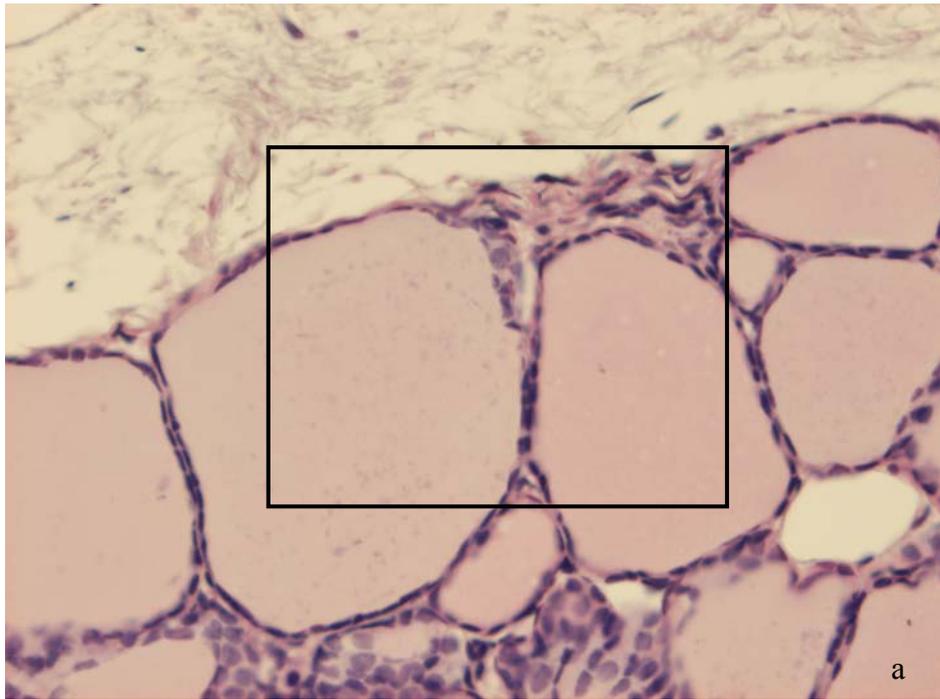
## 3 Befunde

### 3.1 Allgemeine Morphologie

Bevor auf die immunhistochemischen Ergebnisse eingegangen wird, soll zunächst die Morphologie der C-Zellen und des sie umgebenden Gewebes beschrieben werden.

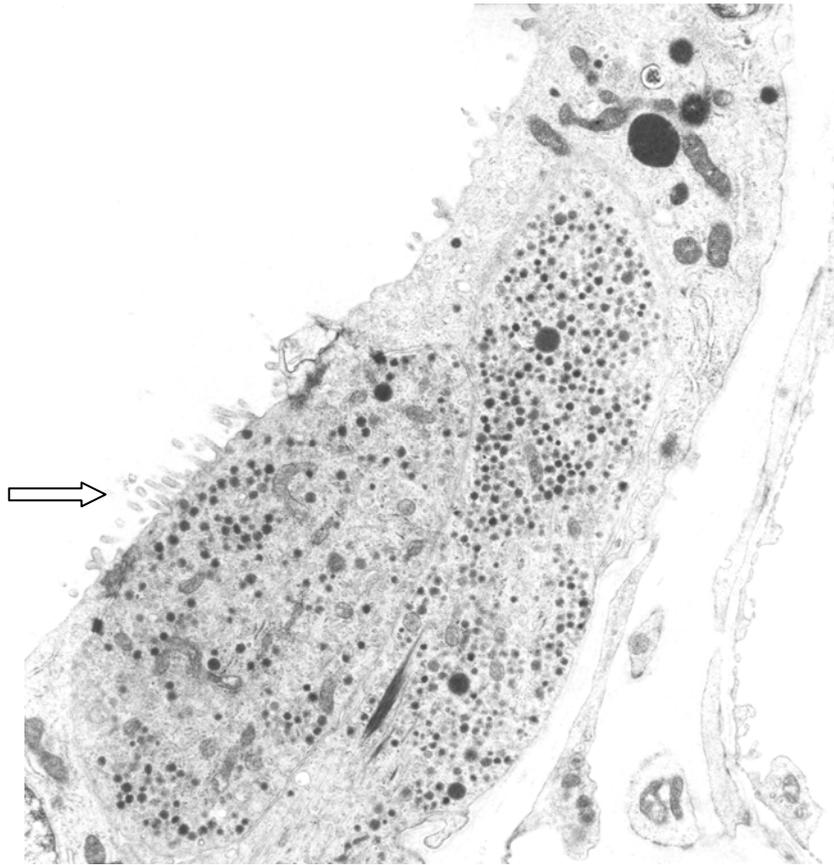
Wie bei anderen Säugetieren besteht die Schilddrüse des kleinen Igel Tenrek aus Follikeln, welche vom interfollikulären lockeren Bindegewebe umgeben sind, das Blutgefäße und Nerven enthält. Die beiden Schilddrüsenlappen, die nicht durch einen Isthmus miteinander verbunden sind, sind von einer bindegewebigen Kapsel umgeben. Die unterschiedlich großen Follikel werden von einem einschichtigen Epithel, den Thyreozyten, gebildet, das je nach Funktionszustand platt, iso-, oder hochprismatisch ist. Das Zentrum der Follikel ist mit Kolloid ausgefüllt. Fixierungsbedingt ist das Kolloid teilweise vom Epithel abgelöst. Auch treten sogenannte Randvakuolen auf, die als Zeichen vermehrter Kolloidresorption oder als fixationsbedingtes Artefakt gedeutet werden.

Bereits in HE-gefärbten Paraffinschnitten, insbesondere aber in Toluidinblau gefärbten 0,5 µm dünnen Kunstharzschnitten, ist es möglich, C-Zellen im Follikelepithel von den Thyreozyten aufgrund ihres helleren Zytoplasmas zu unterscheiden (Abb. 3) Die großen, länglichen C-Zellen liegen bevorzugt einzeln an der Basis des Epithels zwischen den Thyreozyten und der Basalmembran. Vereinzelt konnten auch Gruppen von C-Zellen beobachtet werden. Eine interstitielle Lage der C-Zellen, d.h. außerhalb der Follikel, wurde nicht beobachtet.



**Abb. 3** C-Zelle im Follikelepithel der Schilddrüse von *Echinops telfairi* (Pfeil in **b**). H.E. gefärbter Paraffinschnitt . **a** Übersicht; **b** Vergrößerung des Rechtecks in a. Original vergrößerung **a** x200, **b** x 400.

Ultrastrukturell unterscheiden sich die C-Zellen von den Thyreozyten durch die Anwesenheit von zahlreichen Sekretgranula mit elektronendichtem Inhalt, die im gesamten Zytoplasma vorkommen (Abb. 4). Der Kern der Zellen ist überwiegend glatt und zeigt vereinzelt Invaginationen. Er enthält wenig Heterochromatin und ein oder zwei Nucleoli. Das ausgeprägte raue endoplasmatische Retikulum und die Polysomen sind über das Zytoplasma verteilt, der Golgi-Apparat liegt in der Nähe des Kernes. Mitochondrien vom Crista-Typ und Lysosomen mit heterogenem Inhalt kommen vereinzelt vor. In einigen Fällen wurde der Kontakt von C-Zellen mit dem Follikellumen beobachtet (Abb. 4). Hierbei war die apikale Oberfläche der C-Zellen durch kurze Mikrovilli vergrößert und die C-Zellen über epitheliale Verbindungskomplexe mit den Thyreozyten verbunden.



**Abb. 4** Zwei C-Zellen im Schilddrüsenepithel des kleinen Igel Tenrec, *Echinops telfairi*. Das Zytoplasma ist angefüllt mit zahlreichen elektronendichten Sekretgranula. Eine der beiden Zellen hat Kontakt mit dem Follikellumen (Pfeil). Ihre Oberfläche zeigt mehrere Mikrovilli. x 9700.

## 3.2 Immunhistochemie

### Formaldehydfixierung, Unicryleinbettung

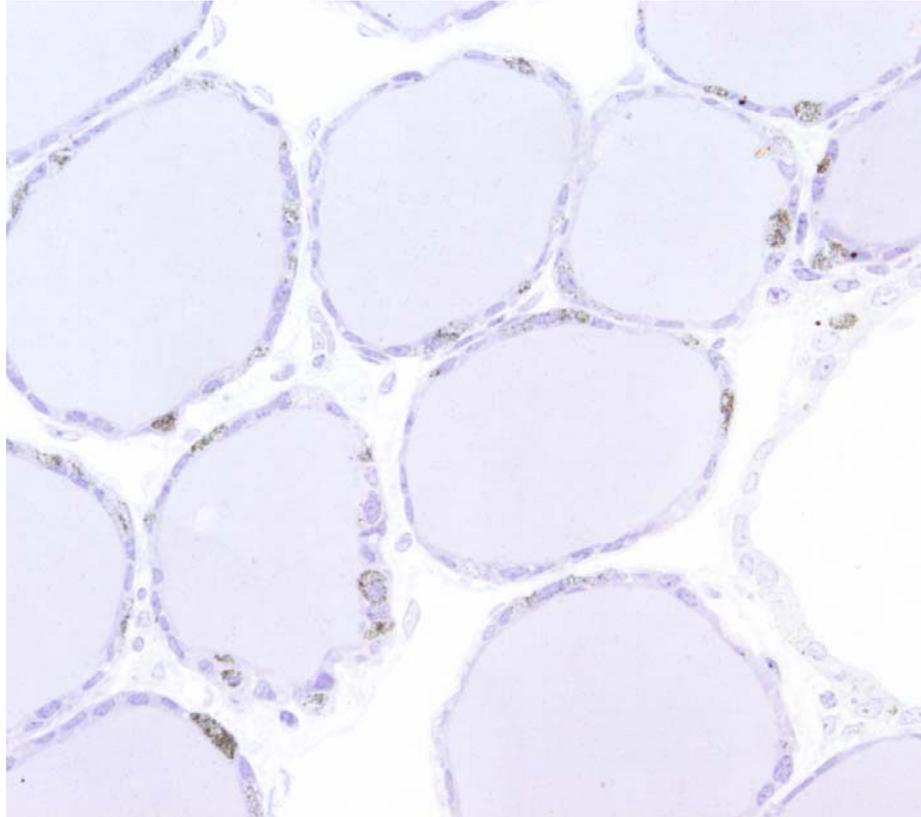
#### Lichtmikroskopie

Subpopulationen endokriner Zellen können bestimmt werden, indem z.B. konsekutive Schnitte einer Serie mit verschiedenen Antisera inkubiert und definierte Zellen in den Schnittserien verfolgt werden (Grube und Kusomoto, 1986). Um jedoch die gleiche Zelle in einer größeren Serie verfolgen zu können, ist es notwendig, möglichst dünne

Schnitte zu untersuchen. Aus diesem Grunde wurden in der vorliegenden Arbeit zunächst Serienschnitte mit einer Dicke von 0,5 µm von formaldehydfixiertem, in Kunstharz (Unicryl) eingebettetem Schilddrüsengewebe angefertigt und mit Antiseren gegen Calcitonin, CGRP, Serotonin, CgA, Sg II, NSE, NFPC, S-100 und Somatostatin inkubiert. Dieses Einbettungsverfahren bietet zusätzlich die Möglichkeit, die Immunreaktivität(en) auch ultrastrukturell zu lokalisieren.

Von den eingesetzten Antiseren zeigte nur das Anti-Calcitonin Serum eine positive Immunreaktion an Semidünnschnitten des in Formaldehyd fixierten und in Unicryl eingebetteten Gewebes. Die Immunreaktivität war nur über dem Zytoplasma der C-Zellen in einer feingranulären Verteilung zu beobachten, während die Zellkerne der C-Zellen, die Thyreozyten, das Kolloid und das interfollikuläre Bindegewebe keine Reaktion zeigten (Abb. 5) .

Die Antiseren gegen Serotonin, CGRP, CgA, Sg II, NSE, NFPC, S-100 und Somatostatin ergaben trotz des Versuches der Antigen-Demaskierung (Trypsin, Mikrowelle) weder an C-Zellen noch an anderen thyroidalen Zellen eine Immunreaktion in dem so fixierten und eingebetteten Gewebe.

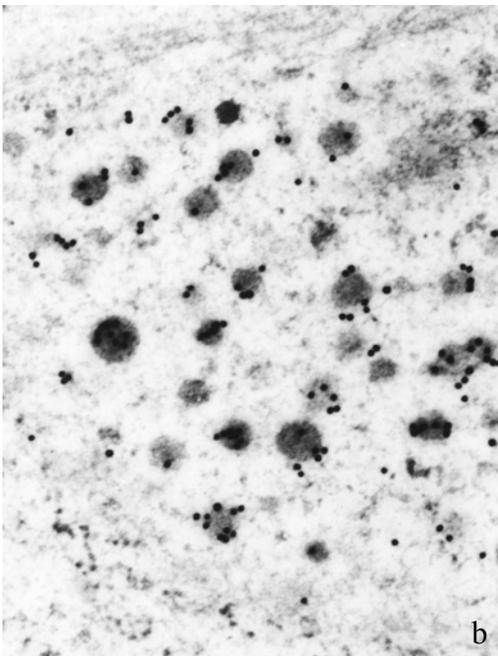
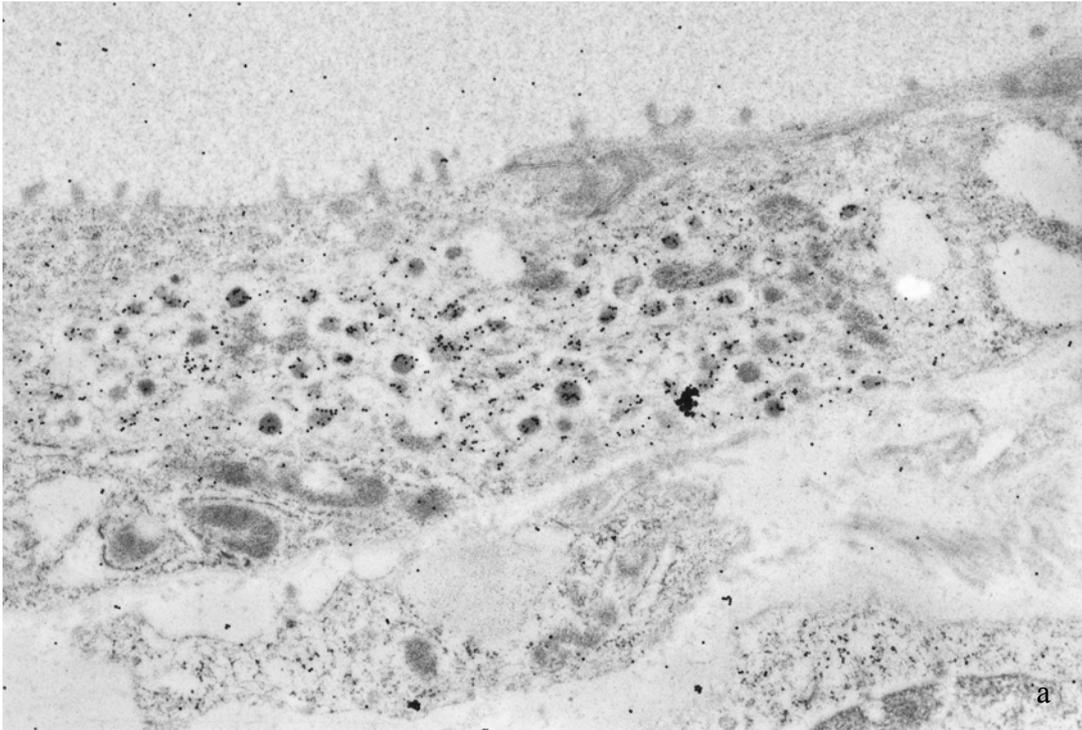


**Abb. 5** Darstellung der C-Zellen mit einem Calcitonin-Antikörper. Die Immunreaktion ist auf das Zytoplasma der C-Zellen beschränkt. x 200.

### **Elektronenmikroskopie**

Immungold-Komplexe waren nach Inkubation der Schnitte mit einem anti-Calcitonin Aniserum vor allem über den Sekretgranula der C-Zellen lokalisiert. Diese Immunreaktivität hob sich deutlich vom geringen Hintergrund der Goldpartikel ab, der gleichmäßig über das Zytosol, die Mitochondrien und den Kern der C-Zellen sowie über die Thyrozyten und das Kolloid verteilt war (Abb.6).

Außer Calcitonin zeigten die übrigen bereits an 0,5 µm dicken Unicrylschnitten getesteten Antiseren (siehe oben) auch an Ultradünnschnitten keine Immunreaktion.



**Abb. 6** Ultrastrukturelle Lokalisation der Calcitonin-Immunreaktivität in C-Zellen der Schilddrüse von *Echinops telfairi*. **a** Übersicht. Die Immungoldkomplexe sind überwiegend im Bereich der C-Zelle lokalisiert. Einzelne Goldpartikel kommen als Hintergrund über dem Follikllumen (im Bild oben) und dem interfollikulären Bindegewebe (im Bild unten) vor. **b** Die Mehrzahl der Immungoldkomplexe ist mit den Sekretgranula im Zytoplasma der C-Zelle assoziiert. **a** x 19000; **b** x 47000.

### **Formaldehydfixierung, Paraffineinbettung**

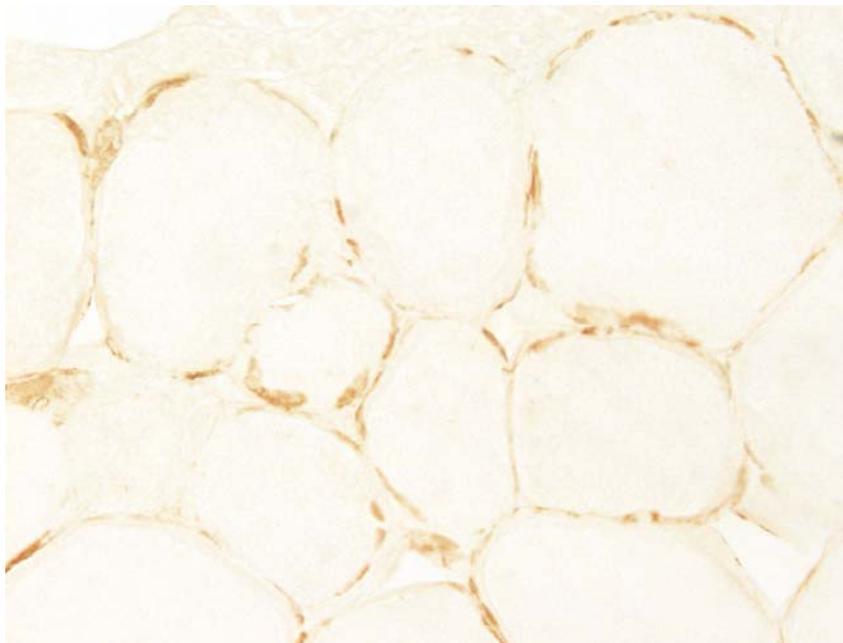
Da von den eingesetzten Antiseren nur das Calcitonin-Antiserum eine positive Immunreaktion an dem in Kunstharz eingebetteten Gewebe ergab, musste das ursprüngliche Ziel, potentielle Subpopulationen der C-Zellen in Unicrylschnitten zu identifizieren, aufgegeben werden. Es wurde deshalb in Paraffin eingebettetes Gewebe mit der Avidin-Biotin-Peroxidasekomplex-Technik (s. Abb.2) untersucht. Hierbei zeigten die verschiedenen getesteten Antiseren eine gut reproduzierbare Immunreaktion nach Demaskierung der Antigene durch die Behandlung in der Mikrowelle. Bei anfänglichen Versuchen ohne Vorbehandlung der Schnitte in der Mikrowelle zeigte nur das Anti-Calcitonin-Antiserum eine Immunreaktion. Ein Einfluß der verwendeten Puffer, PBS (Lösung A) bzw. Natriumazetat- und Natriumboratpuffer (Lösung B), auf die immunhistochemische Reaktion konnte nicht festgestellt werden.

Da die Paraffinschnitte eine Dicke von ca. 4-5  $\mu\text{m}$  haben, sind individuelle C-Zellen in der Regel nur in wenigen aufeinanderfolgenden Schnitten präsent und sehr viel schwerer oder gar nicht wieder aufzufinden, da in den Folgeschnitten oft nur feine Zellausläufer auftreten. Aus diesem Grund wurde der prozentuale Anteil der für eine der untersuchten Substanzen immunreaktiven Zellen an den Calcitonin-immunreaktiven in einem Feld von 10 Follikeln bestimmt. Es wurde davon ausgegangen, dass alle C-Zellen Calcitonin-immunreaktiv sind, so dass die Calcitonin-immunreaktiven Zellen als Gesamtpopulation der C-Zellen (100%) angesehen wurden. Schnittpaare wurden untersucht, von denen der erste Schnitt mit dem Anti-Calcitonin Immunserum, der zweite mit einem anderen Antiserum inkubiert war (s. Abb. 8-11) .

Nachfolgend werden daher die immunzytochemischen Reaktionen der getesteten Antisera an in Formaldehyd fixiertem, in Paraffin eingebettetem Gewebe beschrieben.

### **Calcitonin**

Aufgrund der im Vergleich mit den Unicryl Schnitten relativ dicken Paraffinschnitte zeigten die positiv reagierenden Zellen keine feingranuläre Signalverteilung, sondern eine homogen erscheinende Anfärbung des Zytoplasmas. Die Zellkerne wiesen keine Immunreaktivität auf. Die Form der immunreaktiven Zellen war flach und länglich, in tangentialen Anschnitten der Follikel stellten sie sich rund dar. Es konnten viele kleinere Zytoplasmaausläufer beobachtet werden, bei denen der Kern nicht mit angeschnitten war. Die Verteilung der Immunreaktion innerhalb der Zellen war homogen ohne apikale oder basale Anreicherung, d.h eine Polarität lag nicht vor (Abb. 7).



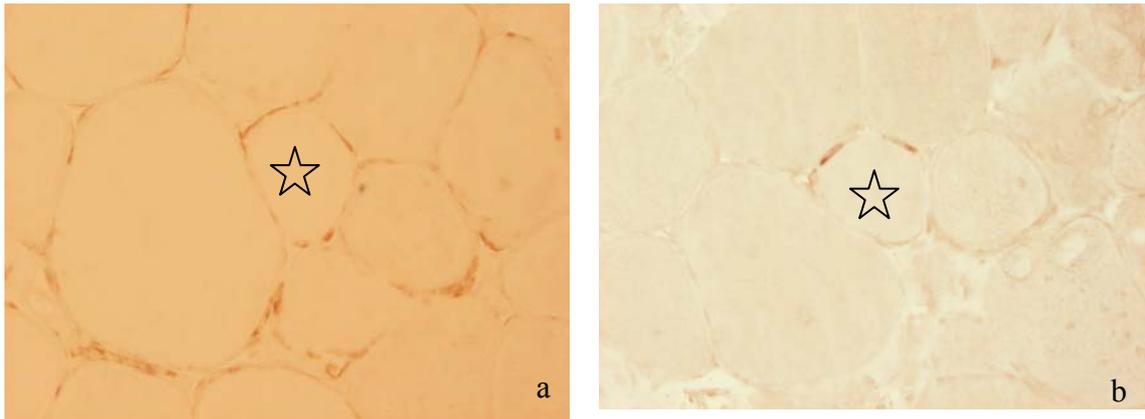
**Abb. 7** Calcitonin-immunreaktive C-Zellen in der Schilddrüse des kleinen Igel Trenrec, *Echinops telfairi*. Parafinschnitt, x 200.

Die Calcitonin-immunreaktiven Zellen waren diffus über die Follikel verteilt. Ein bestimmtes Verteilungsmuster dieser Zellen in Bezug zum Schilddrüsenlappen war nicht erkennbar.

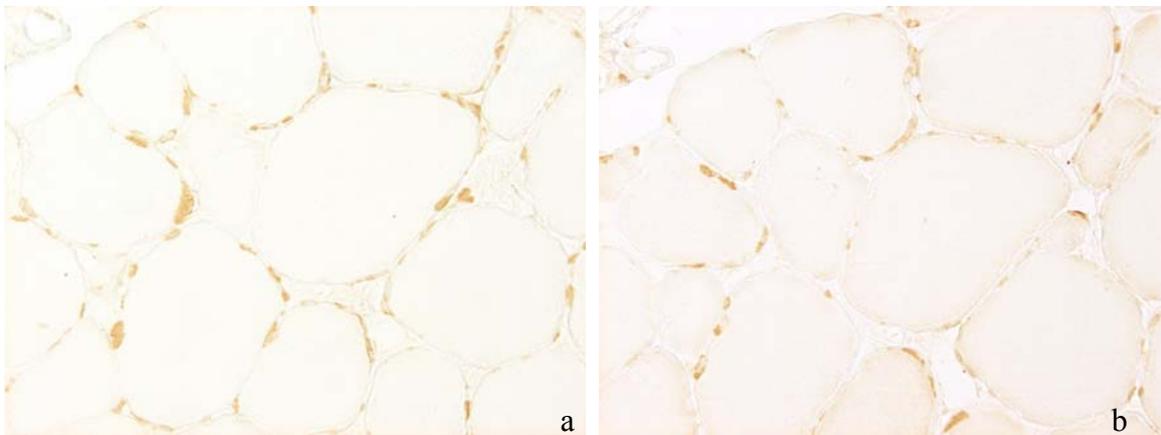
Von den eingesetzten Antiseren zeigten CGRP, Serotonin, CgA, SgII, NSE und NFPC eine Immunreaktivität über einzelnen Zellen im Follikelepithel, die nach Lage, Form und Größe C-Zellen entsprachen (Abb. 8-11). Bei allen Antiseren war das Signal homogen über dem Zytoplasma der immunreaktiven Zellen lokalisiert, während die Zellkerne keine Immunreaktivität zeigten. Eine Immunreaktion über Thyreozyten oder nichtfollikulären Strukturen war nicht nachweisbar.

Zur Bestimmung der CgA-Immunreaktivität wurde zuerst ein gegen humanes CgA gerichtetes Antiserum (Bio Trend) eingesetzt, welches keine Immunreaktivität zeigte. Eine positive Immunreaktion wurde ausschließlich mit einem polyklonalen Antiserum gegen CgA der Ratte erzielt.

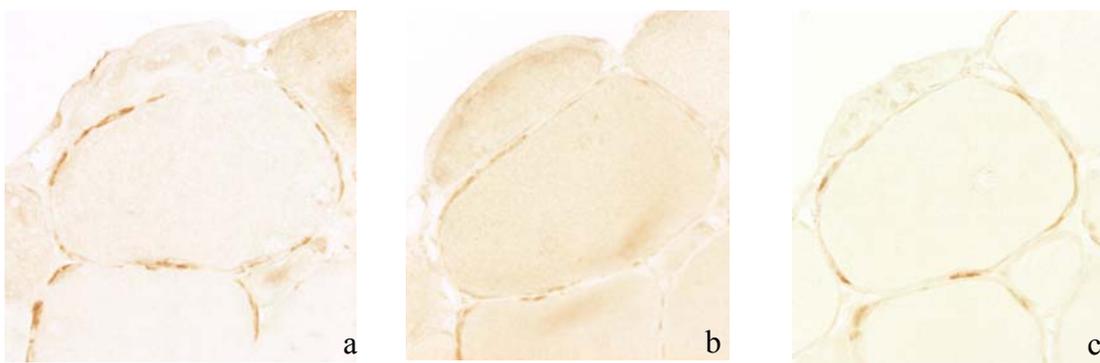
Der Anteil der CGRP-immunreaktiven Zellen an den C-Zellen betrug ca. 30%, während die NSE-, NFPC-, und CgA-immunreaktiven Zellen jeweils ca. 50% (48-52%) der Calcitonin-positiven Zellen ausmachten. Am häufigsten waren die SgII- und Serotonin-immunreaktiven Zellen, deren Anteil ca. 58-60% an der Gesamtpopulation der C-Zellen betrug. Das Somatostatin- und das S-100-Antiserum zeigte keine Immunreaktivität an in Formaldehyd fixiertem, in Paraffin eingebettetem Gewebe.



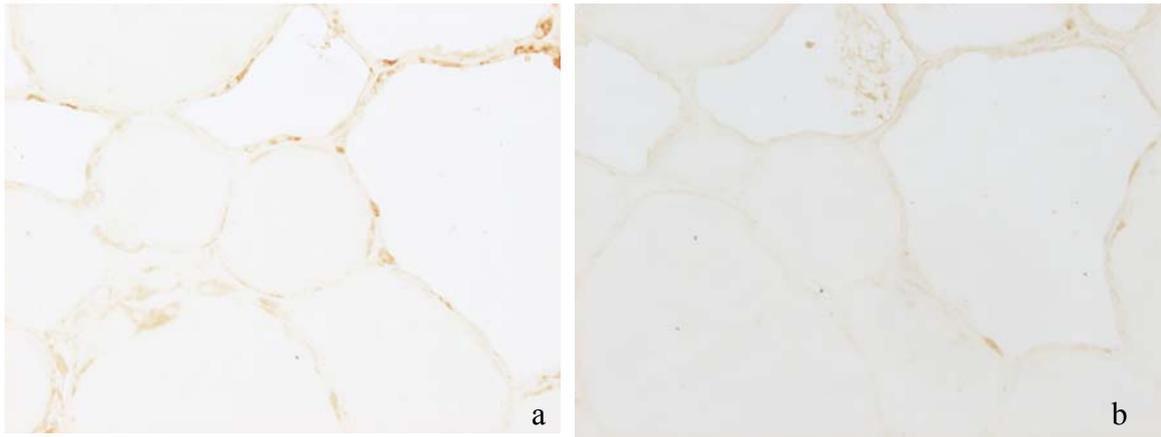
**Abb. 8** Konsekutive Paraffinschnitte der Schilddrüse von *Echinops telfairi*. **a** mit einem anti-Calcitonin Antikörper, **b** mit einem anti- CGRP Antikörper inkubiert. **a, b** x 200.



**Abb. 9** Konsekutive Paraffinschnitte der Schilddrüse von *Echinops telfairi*. **a** mit einem anti-Calcitonin Antikörper, **b** mit einem anti-Serotonin Antikörper inkubiert. **a, b** x 200.



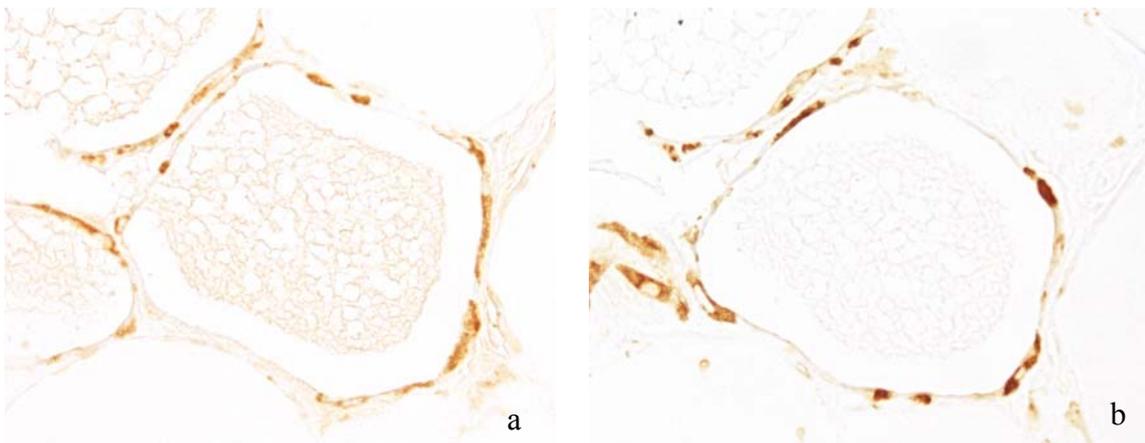
**Abb. 10 a** Konsekutive Paraffinschnitte der Schilddrüse von *Echinops telfairi*. **a** mit einem anti-Calcitonin Antikörper, **b** mit einem anti-Cg A Antikörper, **c** mit einem anti-Sg II Antikörper inkubiert. **a, b, c** x 200.



**Abb. 11** **a** Konsekutive Paraffinschnitte der Schilddrüse von *Echinops telfairi*. **a** mit einem anti-Calcitonin Antikörper, **b** mit einem anti- NSE Antikörper inkubiert. **a, b** x 200.

### Lektine

Von der Vielzahl der getesteten Lektine (siehe Tab. 2) zeigte nur das WFA eine spezifisch hemmbare und reproduzierbare Bindung an Calcitonin-immunreaktiven Zellen.



**Abb. 12** Konsekutive Paraffinschnitte der Schilddrüse von *Echinops telfairi*. **a** mit einem anti-Calcitonin Antikörper, **b** mit dem Lektin WFA inkubiert. **a, b** x 200.

## 4 Diskussion

Die morphologischen und immunhistochemischen Befunde der vorliegenden Arbeit an der Schilddrüse des kleinen Igel Tenrek zeigen, dass die C-Zellen

1. nur im Follikel­epithel und nicht zwischen den Follikeln vorkommen;
2. in Paraffinschnitten eine positive Immunreaktion gegen Calcitonin- und - in unterschiedlichem Ausmaß - gegen CGRP-, Serotonin-, CgA-, SgII-, NSE- und NFPC Antiseren aufweisen;
3. in Kunstharzschnitten dagegen nur auf das Antiserum gegen Calcitonin, jedoch nicht auf die Antiseren gegen CGRP, Serotonin, CgA, SgII, NSE und NFPC positiv reagieren; und
4. auf Antiseren gegen Somatostatin und S-100 weder in Paraffin- noch in Kunstharzschnitten Immunreaktivität zeigen.

### Methoden

Mit den verschiedenen Antiseren, die in der vorliegenden Arbeit an der Schilddrüse des Tenreks eingesetzt wurden, wurden in Abhängigkeit vom Einbettungsmedium Paraffin oder Kunstharz (Unicryl) unterschiedliche Ergebnisse erzielt. Während Calcitonin-Immunreaktivität mit allen eingesetzten Methoden sowohl lichtmikroskopisch an Paraffin- und Kunstharz-Schnitten als auch elektronenmikroskopisch an Kunstharz-

Schnitten nachgewiesen wurde, zeigten die Antiseren gegen CGRP, Serotonin, CgA, SgII, NSE und NFPC bei gleichen Fixierungsbedingungen und gleichem immunhistochemischen Protokoll nur an in Paraffin, nicht aber an in Kunstharz eingebettetem Gewebe Immunreaktivität.

Die unterschiedliche Reaktivität der gleichen Antiseren kann verschiedene Ursachen haben. Sie kann einerseits dadurch bedingt sein, dass das Antigen durch das Einbettungsmedium (Kunstharz) maskiert wird und damit die Antigen-Antikörper-Reaktionen eingeschränkt bzw. verhindert werden. Dass die Maskierung eines Antigens durch das Einbettungsmedium für die Antigen-Antikörper-Reaktion tatsächlich eine Rolle spielt, wurde an Paraffinschnitten demonstriert, die zum Zwecke der Antigen-Demaskierung in der Mikrowelle behandelt wurden. Während das Anti-Calcitonin-Antiserum auch ohne Behandlung in der Mikrowelle eine positive Immunreaktion zeigte, konnte diese auf die anderen untersuchten Antiseren (CGRP, Serotonin, CgA, SgII, NSE und NFPC) nur an den in der Mikrowelle behandelten Schnitten beobachtet werden.

Die Unicrylschnitte wurden ebenfalls in der Mikrowelle erwärmt bzw. mit Trypsin vorbehandelt (Suurmeijer und Boon, 1993). Hier reagierte aber trotz des Versuches der Antigen-Demaskierung keines der eingesetzten Antiseren bis auf das gegen Calcitonin gerichtete positiv. Die Antigene scheinen also auch durch die Wahl des Fixierungsmittels und Einbettungsvorgänge beeinflusst zu werden. Auch kann die fehlende Reaktion an Semi- und Ultradünnschnitten darauf beruhen, dass die Menge des vorhandenen Antigens in diesen Schnitten auf Grund ihrer geringeren Dicke wesentlich kleiner ist als in Paraffinschnitten und damit unter der Nachweisgrenze liegt.

## **Calcitonin**

Alle Zellen, die morphologisch als C-Zellen identifiziert wurden, zeigten nach Inkubation mit dem anti-Calcitonin-Antiserum eine Immunreaktivität. Diese war mit sämtlichen eingesetzten Methoden (Paraffin, Kunstharz, EM) reproduzierbar. Ultrastrukturell ist die ausschließliche Lokalisation der Immungoldkomplexe über den Sekretgranula der C-Zellen und ihr Fehlen sowohl über den Kernen und Mitochondrien der C-Zellen sowie über dem Zytoplasma der Thyreozyten, dem Follikellumen und dem interfollikulären Bindegewebe ein Beweis für die hohe Spezifität der Immunreaktion. Die subzelluläre Lokalisation nur über den Sekretgranula der C-Zellen steht im Einklang mit Untersuchungen an anderen Säugetieren, bei denen anti-Calcitonin-Immungoldkomplexe ebenfalls über den Sekretgranula, aber nicht über anderen Zellorganellen wie Kern und Mitochondrien nachgewiesen wurden (Zabel, 1984; Kakudo et al., 1989).

Bei der Auswertung der Schnittpaare wurden keine Zellen beobachtet, die eine Immunreaktion auf eines der eingesetzten Antiseren gegen CGRP, Serotonin, CgA, SgII, S-100 und NFPC, aber keine Immunreaktivität auf das anti-Calcitonin-Antiserum zeigten. Es kann daher, wie ursprünglich postuliert, davon ausgegangen werden, dass das anti-Calcitonin-Antiserum bei *Echinops telfairi* alle C-Zellen erfasst und dass Calcitonin wie bei anderen Säugetieren der am besten geeignete immunzytochemische Marker zur Identifizierung der C-Zellen ist.

## **CGRP**

Bereits in der Einleitung wurde erwähnt, dass die Transkription des Calcitonin  $\alpha$ -Gens dazu führt, dass CGRP und Calcitonin coexprimiert werden. Diese Tatsache lässt erwarten, dass alle C-Zellen auch CGRP-immunreaktiv sind. Entsprechende Befunde konnten bei einer Reihe von Säugetieren, wie z.B. Hund, Katze, Ratte, Affe und Kaninchen erhoben werden (Kameda, 1987; Zabel et al., 1987). Die Befunde der vorliegenden Arbeit weichen aber von dieser Erwartung insofern ab, als nur bei ca. 30% der Calcitonin-immunreaktiven Zellen CGRP-Immunreaktivität beobachtet wurde. Tatsächlich sind ähnliche Unterschiede in der Calcitonin- und CGRP-Immunreaktivität auch für die C-Zellen von Schwein, Maus, Hamster, und Meerschweinchen beschrieben, bei denen eine CGRP-Immunreaktivität nur schwach oder auch gar nicht nachzuweisen war (Kameda, 1987; Zabel et al., 1987).

Die Ursache dafür, dass CGRP nur in einem Teil der Calcitonin produzierenden Zellen nachweisbar ist, könnte z.B. in der posttranskriptionalen Regulation des Calcitonin  $\alpha$ -Gens liegen. Die funktionelle Bedeutung dieser Unterschiede ist bisher nicht bekannt.

Es bleibt jedoch festzuhalten, dass beachtliche Spezies-abhängige Unterschiede hinsichtlich der Coexpression von Calcitonin und CGRP in den C-Zellen der Schilddrüse vorkommen. Untersuchungen in der Humanmedizin haben gezeigt, dass CGRP in der Schilddrüse die Hormonsekretion von Thyreozyten hemmt (Ahren, 1991) und die C-Zellen zur Calcitonin-Sekretion anregt (Cooper et al., 1991). Ferner ist eine vasodilatierende Wirkung von CGRP beschrieben (Girgis et al., 1985).

Der immunhistochemische Nachweis von CGRP in C-Zellen lässt vermuten, dass dieses Peptid bei *Echinops Telfairi* ähnliche regulatorische Eigenschaften aufweist wie bei höheren Säugetieren, d.h. die Sekretion von T3 und T4 hemmt und autokrin die Calcitonin-Sekretion stimuliert. Auch könnte es über seine vasodilatierenden Eigenschaften in die lokale Regulation der Durchblutung der Schilddrüse eingreifen.

### **Serotonin**

Frühere immunhistochemische Untersuchungen an C-Zellen verschiedener Säuger aber auch an menschlichen C-Zell-Linien haben gezeigt, dass diese Zellen auch Serotonin enthalten (Gaberscek et al., 1997; Majdic et al., 1993; Zabel 1984). In der vorliegenden Arbeit wurde Serotonin-Immunreaktivität in ca. 60% der Calcitonin-positiven Zellen nachgewiesen. Während Serotonin-Immunreaktivität bei Ratten in allen C-Zellen beschrieben wurde (Zabel, 1984), zeigen bei anderen Säugern, wie z.B. Hund, Kaninchen und Schwein, nur sehr wenige C-Zellen Serotonin-Immunreaktivität (Majdic et al., 1993). Der kleine Tenrec nimmt hinsichtlich der Serotoninproduktion in C-Zellen offenbar eine Mittelstellung ein. Die Tatsache, dass bei *Echinops telfairi* nicht alle C-Zellen Serotonin-Immunreaktivität aufweisen, könnte ein Hinweis darauf sein, dass sich diese Zellen in unterschiedlichen Aktivitätszuständen befinden.

Der Nachweis eines biogenen Amins, wie hier Serotonin, und eines Peptidhormons qualifiziert die C-Zellen als Mitglied der Gruppe der APUD-Zellen (Pearse, 1966 a;b). Die von diesen Zellen freigesetzten Amine und Hormone können sowohl eine endokrine, d.h. systemische, Wirkung als auch eine parakrine Wirkung, d.h. auf die

Nachbarzellen, entfalten. Studien an Ratten haben gezeigt, dass Serotonin parakrin als interzelluläres Signalmolekül zwischen C-Zellen und Thyreozyten dient und eine stimulierende Wirkung auf die Thyreozyten hat, wobei es diese zur Hormonsekretion anregt (Veijlsted und Korsgaard, 1976; Sawicki, 1995). Weiterhin wirkt Serotonin autokrin, indem es die C-Zellen selbst zur Hormonproduktion anregt (Sawicki, 1995). Während CGRP und Serotonin auf C-Zellen synergistisch wirken, ist ihre Wirkung hinsichtlich der Hormonsekretion der Thyreozyten antagonistisch.

### **CgA/SgII**

Chromogranin A und Secretogranin II sind saure Glykoproteine, die ursprünglich in den chromaffinen Zellen des Nebennierenmarks entdeckt, aber inzwischen auch in einer Vielzahl neuroendokriner Zellen nachgewiesen wurden (Übersichten: Fischer-Colbrie et al., 1987; Wiedenmann und Huttner, 1989; Winkler und Fischer-Colbrie, 1992). Sie sind in Sekretgranula mit den Katecholaminen bzw. jeweiligen Peptid-Hormonen colokalisiert. Die Funktion der Granine ist erst teilweise aufgeklärt. So ist bekannt, dass aus Graninen durch enzymatische Spaltung andere regulatorisch wirksame Peptide entstehen können (Simon et al., 1988; Winkler und Fischer-Colbrie, 1992). Die Granine sollen außerdem eine Rolle bei der Verpackung von Peptidhormonen spielen (Huttner et al., 1991).

Bisher liegen nur wenige Untersuchungen zum Vorkommen von Graninen in C-Zellen vor. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass bei *Echinops telfairi* ca. die Hälfte aller

Calcitonin-immunreaktiven Zellen CgA- und Sg-II Immunreaktivität aufweisen. Dagegen sind bei der Maus alle C-Zellen CgA-immunpositiv (Sawicki, 1999), während beim Menschen die C-Zellen eine starke CgA-Immunreaktivität, aber eine schwächere Sg II-Immunreaktivität zeigen (Schmid et al., 1992).

Die Beobachtung, dass das Antiserum gegen humanes CgA keine Immunreaktivität zeigte, während das gegen CgA von Ratten gerichtete Antiserum positiv reagierte, spricht dafür, dass humanes CgA sich strukturell oder immunologisch vom Tenrek-CgA unterscheidet. Diese Beurteilung des immunhistochemischen Befundes steht in Einklang mit Untersuchungen von Grube und Yoshie (1989) am Pankreas des Hundes, in denen diese Autoren zunächst mit bovinem CgA-Antiserum keine Immunreaktivität, später dann aber mit CgA-Antiserum von Ratten eine positive Reaktion nachweisen konnten.

Aus anderen Studien z.B. an G-Zellen der Magenschleimhaut und gonadotropen Zellen der Adenohypophyse ist weiterhin bekannt, dass, obwohl ein endokriner Zelltyp die verschiedenen Chromogranine exprimiert, diese in einer individuellen Zelle nicht immer zusammen gespeichert werden und damit nicht in der gesamten Population des betreffenden Zelltyps nachweisbar sind (Cetin und Grube, 1991; Jeziorowski et al., 1997; Lassmann et al. 1986). Es muß daher davon ausgegangen werden, dass sowohl die Expression von Hormon und Chromograninen als auch von Chromograninen untereinander unabhängig voneinander erfolgt.

### **Neuronen-spezifische Enolase (NSE), Neurofilament-Protein (NFP), S-100 Protein**

Die Neuronen-spezifische Enolase ist ein Nervengewebe-spezifisches Isoenzym des glykolytischen Enzyms Enolase und kommt im Zytoplasma reifer Neuronen vor. Immunreaktivität für NSE wurde auch in fast allen Paraneuronen sensorischer und endokriner Natur nachgewiesen (Iwanaga et al., 1989).

Ein Vergleich mehrerer Tierarten ergibt ebenfalls kein einheitliches Bild der Immunreaktivität von NSE in C-Zellen. Während bei Ratte, Maus, Hamster und Meerschweinchen alle C-Zellen immunreaktiv auf NSE waren (Zabel et al.; 1988), reagierten beim hier untersuchten *Echinops telfairi* nur ca. 48% der C-Zellen positiv auf das NSE-Antiserum. Ähnliche Beobachtungen wurden an C-Zellen von Schweinen gemacht. Hier zeigte auch nur ein Teil der C-Zellen NSE-Immunreaktivität. Kaninchen dagegen wiesen keine NSE-Immunreaktivität in C-Zellen auf (Zabel et al., 1988).

Neurofilament-Protein ist ein neuronales Protein des Zytoskeletts, welches in Neuronen, aber auch in C-Zellen nachgewiesen werden kann (Iwanaga et al., 1989). Dies bestätigt sich auch beim *Echinops telfairi*, bei dem ca. 50% der C-Zellen eine Immunreaktivität zeigten.

Das S-100 Protein ist ein Calcium-bindendes Protein, welches in paraneuronalen Zellen und Gliazellen vorkommt (Iwanaga et al., 1989). Wie in Untersuchungen an verschiedenen anderen Säugetieren (Zabel und Dietl, 1987b) konnte keine Immunreaktivität der C-Zellen von *Echinops Telfairi* nachgewiesen werden.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass auch die C-Zellen von *Echinops Telfairi* in der Lage sind, neuronenspezifische Marker wie NSE und NFP zu exprimieren. Dies

könnte als Ausdruck ihrer Abstammung aus der Neuralleiste interpretiert werden (Pearse und Polak, 1971). Offen bleibt jedoch die Frage, warum in der vorliegenden Arbeit diese neuronalen Marker nur in einer Subpopulation der C-Zellen nachweisbar waren.

### **Somatostatin**

Bei den durchgeführten immunhistochemischen Untersuchungen dieser Arbeit konnten mit sämtlichen eingesetzten Methoden keine Somatostatin-immunreaktiven C-Zellen nachgewiesen werden. Somatostatin-Immunreaktivität wurde von Zabel (1988) in C-Zellen von Ratte, Meerschwein, Kaninchen und Schwein beschrieben. Allerdings wurde in der gleichen Studie bei Mäusen keine Somatostatin-Immunreaktivität gefunden.

Somastostatin, ein Peptidhormon mit vielfältiger Wirkung, wurde ursprünglich als hypothalamischer Gegenspieler des Wachstumshormones isoliert (Shulkes, 1994), konnte aber auch in anderen hormonproduzierenden Zellen des Magen-Darm-Traktes in den D-Zellen des Pankreas und in neuronalen Zellen des Zentralen und peripheren Nervensystems nachgewiesen werden (Steiner et al., 1987; Efendic et al., 1978). Somatostatin zeigt inhibitorische Wirkung auf die Insulin- sowie Glucagon-Produktion im Pankreas und auf die Produktion lokaler Hormone im Gastrointestinaltrakt (Efendic, 1978). In der Schilddrüse hemmt es die Sekretion von Calcitonin und Schilddrüsenhormon (Ahren, 1991).

In der vorliegenden Arbeit wurden mit CGRP und Serotonin zwei Moleküle immunhistochemisch in den C-Zellen von *Echinops Telfairi* lokalisiert, die die Calcitonin-Sekretion stimulieren. Es stellt sich die Frage, ob Moleküle vorhanden sind, welche hemmende Wirkung auf die Calcitonin-Sekretion haben, und wenn ja, welche außer Somatostatin diese Aufgabe erfüllen.

### **Lektine**

Wenige Untersuchungen haben sich bisher der lektinhistochemischen Charakterisierung von C-Zellen gewidmet. Im Gegensatz zu Untersuchungen an C-Zellen der Ratte, bei denen von Ulex Europaeus Agglutinin- (UEA-1-) Bindungsstellen berichtet wurde (Moreno et al., 1989), wurde für dieses Lektin wie für zahlreiche andere (siehe Tab. 2) an den C-Zellen von *Echinops Telfairi* keine Bindungsstellen nachgewiesen. In der vorliegenden Arbeit konnte eine spezifische Bindung von Wisteria Floribunda Agglutinin (WFA) an C-Zellen bei *Echinops Telfairi* gezeigt werden. Diese Befunde deuten auf terminale N-Acetylgalaktosamin- und Galaktose-Reste hin. Eine intrazelluläre Lokalisation der WFA-Bindungsstellen, d.h. ob dieses Lektin spezifisch an die Sekretgranula bzw. ihren Inhalt bindet, steht noch aus.

Über die funktionelle Bedeutung der WFA-Bindung kann zum gegebenen Zeitpunkt nur spekuliert werden, insbesondere beim Fehlen einer subzellulären Lokalisation.

## 5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden die C-Zellen der Schilddrüse von *Echinops telfairi* (kleiner Igel Tenrek) untersucht. Die morphologischen und immunhistochemischen Befunde zeigen, dass die C-Zellen nur im Follikelepithel und nicht zwischen den Follikeln vorkommen. In Abhängigkeit vom Einbettungsmedium findet sich eine unterschiedliche Reaktivität der eingesetzten Antiseren: An Paraffinschnitten wurde eine positive Immunreaktion gegen Calcitonin- und in unterschiedlichem Ausmaß gegen CGRP-, Serotonin-, CgA-, SgII-, NSE- und NFP- Antiseren nachgewiesen. In Kunstharzschnitten dagegen reagierte nur das Antiserum gegen Calcitonin positiv, die Antiseren gegen CGRP, Serotonin, CgA, SgII, NSE und NFPC zeigten keine Immunreaktivität. Bei den Antiseren gegen Somatostatin und S-100 wurde weder in Paraffin- noch in Kunstharzschnitten Immunreaktivität gefunden.

Mit CGRP und Serotonin wurden zwei Moleküle immunhistochemisch in den C-Zellen von *Echinops Telfairi* lokalisiert, von denen bekannt ist, dass sie die Calcitonin-Sekretion autokrin bei anderen Spezies wie Ratte und auch Mensch stimulieren. Während bei diesen Spezies die Wirkung von CGRP und Serotonin synergistisch auf C-Zellen ist, ist die parakrine Wirkung auf die benachbarten Thyreozyten antagonistisch, indem die Thyroxinsekretion durch Serotonin stimuliert und durch CGRP gehemmt wird. Obwohl entsprechende Untersuchungen fehlen, legt der Nachweis dieser beiden regulatorischen Moleküle in C-Zellen von *Echinops Telfairi* die Vermutung nahe, dass CGRP und Serotonin ähnliche Wirkungen haben wie bei den o.g. Spezies.

## 6 Literaturverzeichnis

- Ahren B (1991) Regulatory peptides in the thyroid gland-a review on their localization and function. *Acta endocrinol (Copenh)* Mar;124(3): 225-32
- Baber EC (1876) Contributions to the minute anatomy of the thyroid gland of the dog. *Philos. Trans. R. Soc. London, Ser. B* 166, 557
- Bendayan M (1982) Double immunocytochemical labeling applying the protein A-gold technique. *J Histochem Cytochem* 30: 81-85
- Bensley RR (1914) The thyroid gland of the opossum. *Anat Rec* 8: 431
- Boyd WC, Shapleighe S (1954) Specific precipitating activities of plant agglutinins (lectins) *Science* 119: 419
- Brown RW, Chirala R (1995) Utility of microwave-citrate antigen retrieval in diagnostic immunohistochemistry. *Mod Pathol Jun; 8(5): 515-20*
- Bussolati G, Pearse AGE (1967) Immunofluorescent localization of calcitonin in the „C“ cells of pig and dog thyroid. *J Endocrinol* 37(2): 205-9
- Carvalho AF, Pearse AGE (1967) Comparative cytochemistry of C cell esterases in the mammalian thyroid-parathyroid complex. *Histochemie* 8: 175-82
- Carvalho AF, Pearse AGE (1968) Calcitonin Proc Symp Thyrocalcitonin C Cells, 1967, p. 122
- Cetin Y, Grube D (1991) Topology of chromogranins in secretory granules of endocrine cells. *Histochemistry* 96(4): 301-10
- Cooper CW, Mc Pherson MB, Seitz PK, Greeley Gh, Abbas SK, Pickard DW, Care AD (1991) Stimulation of calcitonin secretion in the pig by calcitonin gene-related peptide. *Bone Miner Feb 12(2): 73-9*
- Copp DH, Cameron EC, Cheney BA, Davidson AGF, Henze KG (1962) Evidence for A new hormone from the parathyroid that lowers blood calcium. *Endocrinology* 70: 638-49
- De Mey J (1983) Colloidal gold probes in immunocytochemistry. In: Polak JM, Van Noorden S (eds.) *Immunocytochemistry, practical applications in pathology and biology*. Wright-PSG, Bristol London Boston, pp 55-88
- Dubois MP (1975) Immunoreactive somatostatin is present in discrete cells of the endocrine pancreas. *Proc Natl Acad Sci USA* 72: 1340-43

- Efendic S, Lins PE, Uvnas-Wallensten K (1978) Extrahypophyseal effects of somatostatin. *Ann Clin Res*; 10(3): 151-6
- Ehrenbrand F (1954) Untersuchungen über Genese und Funktion der parafollikulären Zellen der Schilddrüse. *Z Mikrosk-Anat Forsch* 60: 337
- Fischer-Colbrie R, Hagn C, Schober M (1987) Chromogranins A,B and C : widespread constituents of secretory vesicles. *Ann NY Acad Sci* 493: 120-34
- Fontaine J (1974) Les monoamines fluorogènes du corps carotidien et du corps ultimobranchial de souris au corps de la vie embryonnaire. Etude histochemique. *Arch Anat Microsc Morphol Exp* 63: 217-30
- Foster GV, MacIntyre I, Pearse AGE (1964) *Nature (London)* 203: 1029
- Fujita T (1977) Concept of paraneurons. *Arch Histol Jpn*; 40 Suppl: 1-12
- Fujita T (1989) Present Status of paraneuron concept. *Arch Histol Cytol*; 52 Suppl: 1-8
- Gabe M, Matoja MM (1969) Histological data on the calcitonin cells of the thyroid of the garden dormouse. *Arch Anat Microsc Morphol Exp* 58: 105-22
- Gaberscek S, Stiblar-Martinic D, Kalisnik M (1997) The influence on follicular cells FRTL-5 in vitro. *Folia Biol (Praha)* 43(3):105-8
- Getzowa S (1907) *Virchows Arch Pathol Anat Physiol* 188: 181
- Girgis SI, Macdonald DW, Stevenson JC, Bevis PJ, Lynch C, Wimalawansa SJ, Self CH, Morris HR, MacIntyre I (1985) Calcitonin gene-related peptide: potent vasodilator and major product of calcitonin gene. *Lancet* 6;2(8445): 14-6
- Godwin MC (1937) Complex IV in the dog with special emphasis on the relation of the ultimobranchial body to interfollicular cells in the postnatal thyroid gland. *Am J Anat* 60: 299-339
- Gould E, Eisenberg JF (1966) Notes on the biology of the tenrecidae. *Journal of Mammalogy* 47(4): 660-86
- Grandidier G, Petit G (1932) *Zoologie de Madagascar*. Societe d'Editions Geographiques, Maritimes et Coloniales. Paris 258 pp.
- Grube D, Forssmann WG (1979) Morphology and function of the entero-endocrine cells. *Horm Metab Res* Nov 11(11): 589-606
- Grube D, Kusomoto Y (1986) Serial semithin sections in immunohistochemistry: techniques and applications. *Arch Histol Jpn* 49: 391-410

- Grube D, Yoshie S (1989) Immunohistochemistry of chromogranin A and B, and secretogranin II in the canine endocrine pancreas. *Acta Histol Cytol* 52: 287-98
- Herter K (1962) Untersuchungen an lebenden Borstenigeln (Tenrecinae) 1. Über temperaturregulierung und Aktivitätsrhythmik bei dem Igeltanrek *Echinops telfairi*. *Zool. Beiträge N.F.*7: 239-92
- Holick MF, Krane SM, Potts JT (1994) deutsche Ausgabe: Berger M (1995) Funktionsstörungen des Knochen- und Mineralstoffwechsels. In: Isselbacher KJ, , Wilson JD, Martin JB, Fauci AS, Kasper DL (Hrsg.), Schmaizl (Hrsg. dt. Ausgabe): *Harrisons Innere Medizin*, Band 2; 13. Aufl., Blackwell Wissenschaft, Berlin-Wien 356: 2502-4
- Hsu SM, Raine L, Fanger H (1981) Use of a avidin-biotin peroxidase complex (ABC)in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody PAP procedures. *J Histochem Cytochem* 27: 577-80
- Hürtle K (1894) Beiträge zur Kenntnis des Sekretionsvorganges in der Schilddrüse. *Pfluegers Arch. Gesamte Physiol. Menschen Tiere* 56:1
- Huttner WB , Gerdes HH, Rosa P (1991) The granin (chromogranin/secretogranin) Family. *TIBS* 16: 27-30
- Islser H, Thompson B, Tonkin R, Sarkar SK (1960) Three-dimensional structure of the thyroid gland with reference to the basement membrane of the follicles and to the location of "light cells". *Anat Rec* 136: 338
- Isselbacher KJ, Braunwald E, Wilson JD, Martin JB, Fauci AS, Kasper DL(Hrsg.) Schmailzl (Hrsg. dt. Ausgabe): *Harrisons Innere Medizin*, Band 2;13. Aufl., Blackwell Wissenschaft, Berlin-Wien (1995)356: 2502-4
- Iwanaga T, Takahashi Y, Fujita T (1989) Immunohistochemistry of neuron-specific and glia-specific proteins. *Arch Histol Cytol* 52 Suppl: 13-24
- Jezirowski T, Watanabe T, Bargsten G, Grube D (1997) Heterogeneity of pituitary gonadotrope cells in male rats. *Arch Histol Cytol* Oct; 60(4): 355-70
- Jordan RK, McFarlane B, Scothorne RJ (1973) An electron microscopic study of the histogenesis of the ultimobranchial body and of the C-cell system in the sheep. *J Anat* 114: 115-36
- Kakudo K, Itoh Y, Osamura Y, Watanabe K (1989) Electron-immunocytochemical localization of calcitonin and calcitonin-gene-related-peptide in human c cells of the thyroid. *Acta Anat (Basel)* 135(1): 17-21

- Kameda Y, Shigemoto H, Ikeda A (1980) Development and cytodifferentiation of C cell complexes in dog fetal thyroids. An immunohistochemical study using anti-calcitonin, anti-C-thyroglobulin and anti-19S thyroglobulin antisera. *Cell Tissue Res* 206(3): 403-15
- Kameda Y (1987) Localization of immunoreactive calcitonin gene-related peptide in Thyroid C cells from various mammalian species. *Anat Rec* Oct; 219(2): 204-12
- Kirkeby S, Romert P, Gauguin J (1973) Origin of cholinesterase-containing follicle cells and parafollicular cells of the developing thyroid gland in the rat. *Histochemie* 37: 243-50
- Kiyama H, Totsuka S, Yoshimura F (1968) Chronic changes in the parafollicular cells in rats fed a diet of high or low calcium content. *Endocrinol Jpn* 15: 439-55
- Konecki DS, Benedum UM, Gerdes HH, Huttner WB (1987) The primary structure of human chromogranin A and pancreastatin. *J Biol Chem* Dec 15; 262(35): 17026-30
- Kracht J, Hachmeister U, Breustedt HJ, Bönicke J, Lenke M (1968) Immunohistological studies on thyrocalcitonin in c-cells. *Endokrinologie* 52: 395-401
- Kroon DB (1958) The macrothyrocyte as a functional stage of the thyroid cell. *Acta Anat* 33: 76-104
- Künzle H (1998a) Care and breeding of the Madagascan hedgehog tenrec, *Echinopstelfairi*, under laboratory conditions. *Der Tierschutzbeauftragte* 7: 5-12
- Künzle H (1998b) Trigeminal projections to thalamus and subthalamus in the hedgehog tenrec. *Neuroscience* 86: 651-661
- Künzle H (1998c) Cerebello-diencephalic projections to particularly the nucleus ventralis medialis and the zona incerta. *Eur J Neurosci Suppl* 10: 181, 01
- Lassmann H, Hagn C, Fischer-Colbrie R, Winkler H (1986) Presence of chromogranin A, B and C in bovine endocrine and nervous tissues: a comparative immunohistochemical study. *Histochem J* Jul; 18(7): 380-6
- Lietz H (1971) C-cells: source of calcitonin. A morphological review. *Curr Top Pathol* 55: 109-46
- Lietz H, Wöhler J, Pomp H (1971) On the development and ultrastructure of the human thyroid gland. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* 113: 94-110

- Lloyd RV (1984) Immunohistochemistry of neuron specific enolase. *Advances in Immunohistochemistry*. Roland A. DeLellis , Ed., Masson Publishing USA, Inc., New York, pp.127-140
- Loeffel SC, Gillespie GY, Mirmiran SA, Miller EW, Golden P, Askin FB, Siegal GP (1985) Cellular immunolocalization of S100 protein within fixed tissue sections by monoclonal antibodies. *Arch Pathol Lab Med* Feb; 109(2): 117-22
- Ludwig KS (1953) Beiträge zur Schilddrüsenstruktur: II. Gibt es „inter oder parafollikuläres“ Epithel in der Schilddrüse? *Acta Anat* 19: 28-50
- Ludwig KS (1954) Beiträge zur Schilddrüsenstruktur: III. Zur Frage der Makrothyreocyten in der Schilddrüse nebst histophysiologischen Bemerkungen. *Acta Anat* 20: 1-36
- Lupulescu A (1972) Effect of Calcitonin on rabbit thyroid gland. *Endocrinology* 90: 1046-54
- Marks SC Jr (1969) The parafollicular cell of the thyroid gland as the source of an osteoblast-stimulating factor. Evidence from experimentally osteopetrotic mice. *J Bone Joint Surg Am* Vol 51: 875-90
- Marks SC Jr, Walker DG (1969) The role of the parafollicular cell of the thyroid gland in the pathogenesis of congenital osteopetrosis in mice. *Am J Anat* 126: 299-313
- Majdic G, Vaillant C, Pogacnik A, Bavdek SV (1993) Calcitonin- and somatostatin-positive cells in thyroid gland of pigs at different ages. *Histochemistry* Dec100(6):481-4
- Moreno AM, Martin-Lacave I, Montero C, Gomez-Pascual A, Fernandez A, Galera H (1989) Demonstration of sugar residues in the ultimobranchial tubule and thyroid C-cells of the rat using peroxidase labelled lectins. *Anat Histol Embryol* Jun; 18(2): 114-21
- Nonidez JF (1931) The origin of the “parafollicular“ cell, a second epithelial component of the thyroid gland of the dog. *Am J Anat* 49: 479-505
- Nonidez JF (1932) Further observations on the parafollicular cells of the mammalian thyroid. *Anat Rec* 53: 339-53
- Nonidez JF (1933) The “parenchymatous cells “ of Baber, the “protoplasmreiche Zellen” of Hürtle, and the “parafollicular” cells of the mammalian thyroid gland. *Anat Rec* 56: 131-41
- Nunez EA, Gershon MD (1978) Cytophysiology of thyroid parafollicular cells. *Int Rev Cytol* 52: 1-80

- Pearse AGE (1966a) The cytochemistry of the thyroid C cells and their relationship to calcitonin. *Proc R Soc London Ser B* 164: 478-91
- Pearse AGE (1966b) 5-hydroxytryptophan uptake by dog thyroid "C"-cells, and its possible significance in polypeptide hormone production. *Nature (London)* 211: 598-600
- Pearse AGE, Carvalheira AF (1967) Cytochemical evidence for an ultimobranchial origin of rodent thyroid C cells. *Nature (London)* 214: 929-30
- Pearse AGE, Polak JM (1971) Neural crest origin of the endocrine polypeptide (APUD) cells of the gastrointestinal tract and pancreas. *Gut* Oct; 12(10): 783-8
- Peng TC, Cooper CW, Petrusz P, Volpert EM (1975) Identification of C-cells in normal and goitrous rat thyroid tissues using antiserum to rat thyrocalcitonin and the immunoperoxidase bridge technique. *Endocrinology* 97: 1537-44
- Potts JT Jr. (1992) Chemistry of the Calcitonins. *Bone Miner* Mar 16(3): 169-73
- Reynolds J (1963) *J Cell Bio* 17: 208
- Reynolds GM, Young FI, Young JA, Williams A, Rowlands DC (1994) Microwave oven antigen retrieval applied to the immunostaining of cytopathology specimens. *Cytopathology* Dec 5(6): 345-58
- Rogers WH (1929) The development of the pharyngeal derivatives in the white rat (*mus norvegicus albinus*). *Am J Anat* 44: 283-329
- Rohr HP, Hasler K (1968) The parafollicular cells of the thyroid gland as a possible site of production of thyrocalcitonin. An electron-microscopic examination of the thyroid gland of the rat after stimulation by calcium acetate and vitamin d3. *Experientia* 24: 152
- Rother P (1970) Enzyme histochemical findings in the ultimobranchial body of the horse. *Endokrinologie* 56: 92-106
- Saito K (1956) *Kitakanto Igaku* 6: 511
- Sato T, Ishikawa K, Aoi T, Kitoh J, Sugiyama S (1966) Electron microscopic observations on the development of the parafollicular cells from the ultimobranchial cyst in the thyroid gland of the mouse. *Okajimas Folia Anat Jpn* 42: 91-105
- Salzer GM (1971) The pituitary and hormonal calcium regulation system. *Acta Endocrinol (Copenhagen) Suppl.* 157: 1-64
- Sawicki B (1975) *Acta Theriol* 20: 281

- Sawicki B (1995) Evaluation of the role of mammalian thyroid parafollicular cells. *Acta histochem* 97, 389-399
- Schmid KW, Kirchmair R, Ladurner D, Fischer-Colbrie R, Bocker W (1992) Immunohistochemical comparison of chromogranins A and B and secretogranin II with calcitonin gene-related peptide expression in normal, hyperplastic and neoplastic C-Cells of the human thyroid. *Histopathology* Sep; 21(3): 225-32
- Shulkes A (1994) Somatostatin: Physiology and clinical applications. *Baillieres Clin Metab* Jan 8(1): 215-36
- Sikri KL, Varndell IM, Hamid QA, Wilson BS, Kameya T, Pomnder BA, Lloyd RV, Bloom SR, Polak JM (1985) Medullary carcinoma of the thyroid. An immunocytochemical and histochemical study of 25 cases using eight separate markers. *Cancer* Nov 15;56(10): 2481-91
- Simon JP, Aunis D (1988) Secretion of chromaffine cells is controlled by chromogranin A-derived peptides. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 1712-1716
- Storch V, Welsch U (1997) *Systematische Zoologie*. 5. Aufl., Gustav Fischer Verlag: 690-92
- Steiner G, Seeling W, Schusdziarra V, (1987) Effects and side effects of somatostatin. *Anaesthesist* Dec; 36(12): 669-76
- Sternberger LA (1986) *Immunocytochemistry*. Wiley, New York
- Stux M, Thompson B, Isler H, Leblond CP (1961) The "light cells" of the thyroid gland in the rat. *Endocrinology* 68: 292-308
- Sugiyama S (1942) *Jpn J Med Sci* 19: 153
- Sugiyama S, Kitoh J, Yokota S, (1969) On the problem of the development of the parafollicular cells from the human ultimobranchial body in prenatal life. *Okajimas Folia Anat Jpn* 46: 59-63
- Sunder-Plassmann P (1939) Über neuro-humorale Zellen des Vagussystems in der Schilddrüse. *Dtsch Z Chir* 252: 210-16
- Suurmeijer AJ, Boon ME (1993) Notes on the application of microwaves for antigen retrieval in paraffin and plastic tissue sections. *Eur J Morphol* Mar-Jun; 31(1-2): 144-50
- Takagi I, Yamada K, Sugiyama S (1974) The embryonic and postembryonic development of the ultimobranchial body of the hamster (*Cricetus auratus*)-in relation to the differentiation of the parafollicular cells. *Folia Anat Jpn* 50: 359-75

- Takagi K (1922) A cytological study on the dog's thyroid gland. *Folia Anat Jpn* 1: 69
- Van Dyke JH (1945) Behavior of ultimobranchial tissue in the postnatal thyroid gland: Epithelial cysts, their relation to thyroid parenchyma and to "new-growths" in the thyroid gland of young sheep. *Am J Anat* 76: 201-51
- Veijlsted H, Korsgaard O (1976) The serotonin retaining effect of lithium in the rat thyroid. *Acta Endocrinol (Copenh)* Jul; 82(3): 530-4
- Voitkevitch AA (1963) *Arkh Anat Gistol Embriol* 44: 52
- Walker DG (1966) Elevated bone collagenolytic activity and hyperplasia of parafollicular light cells of the thyroid gland in parathormone-treated grey-lethal mice. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* 72: 100-24
- Wiedenmann B, Huttner WB (1989) Synaptophysin and chromogranins/secretogranins-widespread constituents of distinct types of neuroendocrine vesicles and new tools of tumor diagnosis. *Virchows Arch (B)* 58: 95-121
- Winkler H, Fischer-Colbrie R (1992) The Chromogranins A and B: the first 25 years and future perspectives. *Neuroscience* 49: 497-528
- Wollman SH, Neve P (1971) Ultimobranchial follicles in the thyroid glands of rats and mice. *Recent Prog Horm Res* 27: 213-34
- Young DM, Capen CC (1968) Calcitonin, *Proc Int Symp Thyrocalcitonin C Cells*, 1967 p. 181
- Zabel M (1984) Ultrastructural localization of calcitonin, somatostatin and serotonin in parafollicular cells of rat thyroid. *Histochem J* Dec; 16(12): 1265-72
- Zabel M, Biela-Jacek i; Surdyk J; Dietel M (1987a) Studies on localization of calcitonin gene-related peptide (CGRP) in the thyroid-parathyroid complex. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 411(6): 569-73
- Zabel M, Dietel M (1987) S-100 protein and neuron-specific enolase in parathyroid glands and C-cells of the thyroid. *Histochemistry* 86(4): 389-92
- Zabel M, Schäfer H, Surdyk J, Biela-Jacek I (1988) Immunocytochemical Studies on Parafollicular Cells of Various Mammals. *Acta anat.* 131: 222-226
- Zaidi M (1990) Evidence that the action of Calcitonin on rat osteoclasts is mediated by Two G proteins acting via separate post-receptor pathways. *J Endocrinol* 126: 473
- Zuckermandl E (1903) Die Entwicklung der Schilddrüse und der Thymus bei der Ratte. *Anat Hefte Wiesb* 21, 1-28

## **Danksagung:**

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof.Dr. H. Bartels, Anatomische Anstalt der LMU München (Lehrstuhl II), für die hilfreiche Unterstützung und Beratung bei der Durchführung dieser Arbeit und seine nette und vorbildliche Betreuung.

Sehr herzlich bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof.Dr. H. Künzle, Anatomische Anstalt der LMU München (Lehrstuhl III), für die Bereitstellung der untersuchten Gewebeproben.

Weiterer Dank gilt Herrn Dr.rer.nat. T. Jeziorowski für die gute Betreuung und die zahlreichen Anregungen.

Herrn J. Rosenbruch danke ich für die Unterstützung hinsichtlich der EDV- und Computerlogistik.

Nicht zuletzt sei auch Frau U. Fazekas und Frau E. Eppinger für die sehr gute technische Assistenz gedankt.

# Lebenslauf

## ***Persönliche Daten***

Name:	Vonnahme
Vornamen:	Patrick Wilhelm
Anschrift:	Plinganserstr. 25 81369 München
geboren am/in:	18.10.1969 in Brilon
Religion:	römisch-katholisch

## ***Bildungsweg***

1982-1989	Kaiser-Wilhelm-Gymnasium Hannover
1989-1990	Bundeswehr (Sanitätsdienst)
1990-1992	Studium der Sozialwissenschaften Technische Universität Hannover
1992-1993	Ausbildung Morphologie-Assistent Medizinische Hochschule Hannover
1993-2000	Studium der Humanmedizin Ludwig Maximilians Universität München
Juni 2000	Staatsexamen Dritter Teil

## ***AiP***

2001-2002 Krankenhaus München Bogenhausen, Abteilung für Röntgendiagnostik  
(Prof. Ingrisch)

## ***Assistenzarztzeit***

2002-2003 Bezirkskrankenhaus Haar, Radiologische Abteilung